



TITLE:

有毒渦鞭毛藻類における麻痺性貝
毒原因毒素に特異的な硫酸基転移
酵素に関する研究(Dissertation_全
文)

AUTHOR(S):

吉田, 天士

CITATION:

吉田, 天士. 有毒渦鞭毛藻類における麻痺性貝毒原因毒素に特異的な硫酸基転移酵素に関する研究. 京都大学, 1999, 博士(農学)

ISSUE DATE:

1999-01-25

URL:

<https://doi.org/10.11501/3147485>

RIGHT:

有毒渦鞭毛藻類における麻痺性貝毒原因毒素に
特異的な硫酸基転移酵素に関する研究

Studies of sulfotransferases specific to
paralytic shellfish poisoning toxins
in toxic dinoflagellates

吉田 天士
Takashi Yoshida

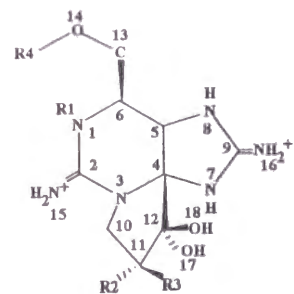
1998

目次

第 1 章	緒言
第 2 章	各海域から分離された <i>Alexandrium tamarense</i> および <i>A. catenella</i> の PSP 毒成分組成比の地域性
第 3 章	<i>Gymnodinium catenatum</i> からの PSP 毒の N21 に硫酸基を付加する酵素 (N-sulfotransferase: N-ST) の精製とその性質
第 4 章	<i>Alexandrium catenella</i> からの麻痺性貝毒硫酸基転移酵素 N-ST の精製とその性質ならびに PSP 原因渦鞭毛藻類における N-ST の分布
第 5 章	<i>Gymnodinium catenatum</i> からの 11-hydroxy STX を基質とする硫酸基転移酵素の精製とその性質ならびに PSP 原因渦鞭毛藻類における O-ST の分布
第 6 章	<i>Gymnodinium catenatum</i> の日周期における PSP 毒量と N-ST 比活性の変動
第 7 章	総括
謝辞	
参考文献	
著者関連文献	

近年の活発な産業活動に伴う多量の工業廃水や生活排水は、海洋や湖沼の富栄養化を引き起こしている。水系の富栄養化は微細藻類の異常増殖による着色現象、すなわち赤潮を招き、水産業に甚大な被害を及ぼしている(岡市 1997)。赤潮による被害形態として、増殖魚介類の大量弊死や、有毒微細藻類による魚介類の毒化が知られている。後者は日本のみならず世界中で頻発しており(Hallegraeff 1995)、また、着色現象を伴わない非常に低密度で発生した場合でも魚介類を毒化させ、これを摂食することで人間に直接被害が及ぶことからより深刻な問題となっている(Shumway 1990, Shumway and Cembella 1993)。毒化した魚介類の摂食による食中毒として、麻痺性貝毒(Paralytic Shellfish Poisoning : PSP)、下痢性貝毒(Diarrhetic Shellfish Poisoning : DSP)、神経性貝毒(Neurotoxic Shellfish Poisoning : NSP)、記憶喪失性貝毒(Amnesic Shellfish Poisoning : ASP) およびシガテラ(Ciguatera)などが報告されている(Hallegraeff 1995)。その中でも *Alexandrium* 属のいくつかの種や *Gymnodinium catenatum* などの渦鞭毛藻類は、1 リットル当たり 200-300 細胞という低濃度でホタテ貝やカキなどの二枚貝の毒化引き起こし、近年では毎年のように PSP が発生している。(大島 1982)。PSP の発生は北米で 1770 年代に初めて記録され(Sommer and Meyer 1937)、現在北米のみならず、チリ南部、南アフリカ(Taylor 1984) さらにオーストラリアでその発生が報告されている(Oshima et al. 1990)。わが国においては、1975 年以来北海道や東北の三陸海岸などの北日本で 二枚貝の毒化現象が顕在化しており(Oshima et al. 1982, Hashimoto and Noguchi 1976)、1993 年からは広島湾のカキにおいてもその発生がみられるようになり、その発生も西日本にまで及んでいる(Oshima 1982, Noguchi et al. 1990)。現在のところ貝類の毒化は全国的に嚴重に監視されており、毒化した貝の摂食による中毒の発生件数は過去に比べて著しく減少した。しかし、許容レベルを超えて毒化した貝類は出荷・流通が禁止されるため、カキやホタテなどの貝類の養殖をはじめとする水産業に与える被害は甚大なものとなっている(小金沢と小谷 1985)。また、最近では貨物船が船体の安定化のために積み込むバラスト水中に有毒微細藻類のシスト(休眠接合子)が混入し、有毒種の伝搬が行われているのではとの問題も新たに提起されており(Hallegraeff et al. 1988, Hallegraeff 1993, 1995)、その PSP の分布域の拡大の原因の解明は急務となっている。

PSP の原因となる毒素(以下 PSP 毒)は、*Alexandrium* 属の種や *G. catenatum* などの渦鞭毛藻類以外にも、珊瑚礁に生息するカニ、巻き貝、石灰藻やラン藻



	R1	R2	R3	R4
STX	H	H	H	^{20 19 21} CONH ₂
neoSTX	OH	H	H	CONH ₂
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂
GTX5	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻
GTX6	OH	H	H	CONHSO ₃ ⁻
epiGTX8 (C1)	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻
GTX8 (C2)	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻
dcSTX	H	H	H	H
dcneoSTX	OH	H	H	H
dcGTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	H
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	H
dcGTX	OH	OSO ₃ ⁻	H	H

Fig. 1-1 Structure of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins.
STX : saxitoxin, GTX : gonyautoxin, neoSTX : neosaxitoxin, dc : decarbamoyl.

からもその存在が報告されている (大島 1992)。PSP 毒は、強力な一群の神経毒で、すべて特異な三環性の骨格を有する低分子化合物であり側鎖構造の差異によりサキシトキシン(Saxitoxin; STX)やゴニオトキシン (Gonyautoxin:GTX) など 20 種余りの成分があり、渦鞭毛藻類の藻体内にはいくつかの成分が同時に含まれていることが明らかとなっている(Fig.1-1) (Schantz et al. 1957, 1966, Shimizu 1979,1993, Oshima et al. 1990)。またそれぞれ比毒性は異なるものの、いずれもフグ毒テトロドトキシン (Tetrodotoxin)と同様に生体膜のナトリウムチャンネルを特異的に阻害する作用を有することから、薬理学ならびに生理学的研究においても注目されている (Schantz et al. 1957, Strichiartz 1984, Strichiartz et al.1986, Henderson et al. 1974)。しかしながら、原因藻の無菌培養の困難さ、増殖の緩慢さ等の原因により、PSP の真の原因を解明する立場にある生物学、生化学的側面からの研究は立ち後れており、とりわけ毒の生合成経路についての知見はほとんど得られていないのが現状である。

さらに近年になって、有毒種である *A. tamarense* の培養株の同一有菌クローン培養に由来する複数のサブクローン間において大きな毒量の差異がみられること(Ogata et al. 1987)や現場海域中での *A. tamarense* のブルームの消長

と貝類の毒化が必ずしも相関しないこと(Kodama 1990) が報告され、PSP 毒産生が有毒渦鞭毛藻類の遺伝的形質であることについて疑問が投げられた。さらに、*A. tamarense* の培養液中から分離された細菌抽出液を HPLC 蛍光分析に供したところ、C4 に一致するピークが認められたことから細菌による PSP 毒産生説が提唱され(Kodama and Ogata 1998, Kodama et al. 1988, 1990, Franca et al. 1995)、PSP 原因生物についての議論は一次混乱した。しかし、1997 年にスペインで開催された第八回国際有害プランクトン会議において、C4 を示すピークをマススペクトル解析を行った結果 PSP 毒成分でないとの発表 (Sato and Shimizu 1997) が行われ、細菌による PSP 毒生産説は疑問視されている

左子ら(1988)は、従来困難であった *A. tamarense* および *A. catenella* の完全な無菌・クローン株を多数分離し、その生活環を明らかにしてきた。その結果、各クローン株は二分裂により無性的に栄養増殖を繰り返すこと、また接合実験により各クローンの交配型が決定できたことから、*A. tamarense* と *A. catenella* の生活環にはヘテロタリックな有性生殖と無性生殖が共に存在することが確認された。

一方、本藻の産生する PSP 毒に関して、これまでも *Alexandrium* 属の培養の増殖段階における毒量及び毒組成の変動について数多くの報告がなされてきた (Oshima and Yasumoto 1978, Ogata et al. 1987, Boyer et al. 1987, Boczar et al. 1988, Anderson et al. 1990a, b, Kim et al 1993a, b)。それらのいずれによっても、細胞当たりの総 PSP 毒量は一般に対数増殖段階で急上昇し、以後、時間の経過に伴い減少する傾向が認められている。この変動は、細胞分裂による娘細胞への毒の分配 (division loss) と異化作用や培養液中への漏出 (true loss)といった損失の総量と PSP 毒生合成量との差を反映しており、対数増殖期には後者が前者を上回るためだと考えられている (Anderson et al.1990a)。また、つい最近になり高度に同調化した *A. fundyense* を用い、PSP 毒の生合成が構成的に行われるのではなく、細胞周期の G1 期のみに行われることが報告された (Taronchen-Oldenbulk et al. 1997)。

一方、毒組成に関しては一定であるという報告 (Boyer et al. 1986, 1987, Cembella et al. 1987)と、変化するという報告がある (Anderson et al. 1990 a, b, Boczar et al. 1988) 。これは培養株や培養条件あるいは分析法が不統一であることに加え、特にそれらの実験に用いられた培養株のほとんどが無菌株ではないことが原因であると考えられた。そこで Kim ら(1993a)は、*A. tamarense* と *A. catenella* の無菌・クローン株を確立し、各増殖段階における毒量と毒組成の変動を詳細に調べた結果、一細胞あたりの PSP 毒量は変化もののその組成はほぼ一定であることを明らかにした。さらに、左子ら(1992)

はこれらの藻類がヘテロタリックな有性生殖を行うことを利用して、PSP 毒組成の異なる親株同士の交配によって得られた子株の毒組成を分析した。その結果、親株と同じ PSP 毒組成比を有する子株がそれぞれ 1 : 1 の割合で出現し、毒組成は両親性 (biparental) 遺伝によって子株へ伝達されることを確認した。このことより PSP 毒組成比を決定する遺伝因子は、藻体自身の染色体に組み込まれていることが示唆された。またその後、藻体が有する毒組成比を比較すると、分離された地域によって毒組成比が異なり、個体群の識別マーカーになりうるのではとの報告がなされた (Kim et al.1990b, Anderson et al. 1994, Oshima et al. 1993)。その一方で、16SrRNA 遺伝子の塩基配列やモノクローナル抗体を用いた有毒種の分子生物学的あるいは生化学的手法を用いた分類法も確立されつつあり (Adachi et al. 1993a, b, 1994)、これらの手法を総合的に用いることで PSP 毒組成比が前述の有毒種の人為的伝播を追跡するためのマーカーになるのではと期待されている。

これまで、PSP 毒の生合成について、有毒ラン藻 *Aphanizomenon flos-aquae* について RI 標識した物質の取り込み実験が行われ、PSP 毒基本骨格がアルギニン、メチオニンおよび酢酸に由来することが明らかになっている (Shimizu 1993, 1996)。前述した有毒種の伝播を追跡する上でも、また、今なお元来プランクトンフィーダーではないカニや巻き貝などを毒化させる生物種が不明であり、これらを特定する上でも PSP 毒の生合成系酵素をコードする遺伝子をプローブとして用いることは非常に有効な手段であると思われる。しかし、その PSP 毒生合成の中間体については全く知見が得られておらず、PSP 毒の生合成系酵素群を解明することは現在のところ不可能である。ここで PSP 毒の側鎖構造について注目してみると、基本骨格に対する N1 位の OH 化、C13 位のカルバモイル化、O11 位及び R4 のカルバモイル基の N21 位への硫酸基の付加反応等が存在する (Fig.1-1)。PSP 毒組成比は、これらの反応の量的な差異あるいは有無で決定されることが考えられるが、上述のように PSP 毒組成比を決定する因子が藻体自身の遺伝情報によるものとするならば、これらの反応は酵素反応にもとづくものと推測される。また、分離される地域によって藻体の持つ毒組成に差異がみられるのは、各酵素の有無や、あるいはその比活性・発現量等に差異があるとすれば理解できる。

特に、藻体には N21 位に硫酸基が付加した C1-4 や GTX5 および GTX6 などの N-スルフォカルバモイル毒群あるいは O11 位に硫酸基を付加した GTX1-4 などの成分が多く含まれる (Kim et al.1993a, b, Sako et al. 1995, Oshima et al. 1990, 1993 a, b)。硫酸基付加反応は、哺乳類においては、ステロイドホルモンやフェノールなどの生理活性物質の解毒および代謝に関わっていることが明

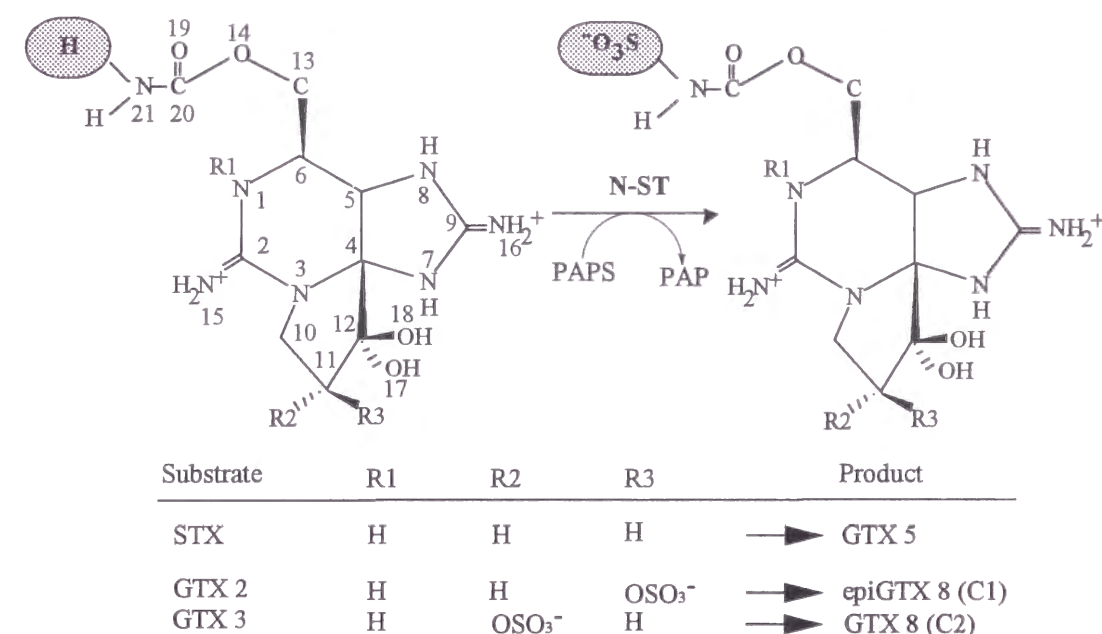


Fig. 1-2 Scheme of the action of N-sulfotransferase (N-ST). N-ST transfers sulfate groups from PAPS to N-21 of STX and GTX2+3 and produces GTX5 and C1+2, respectively.

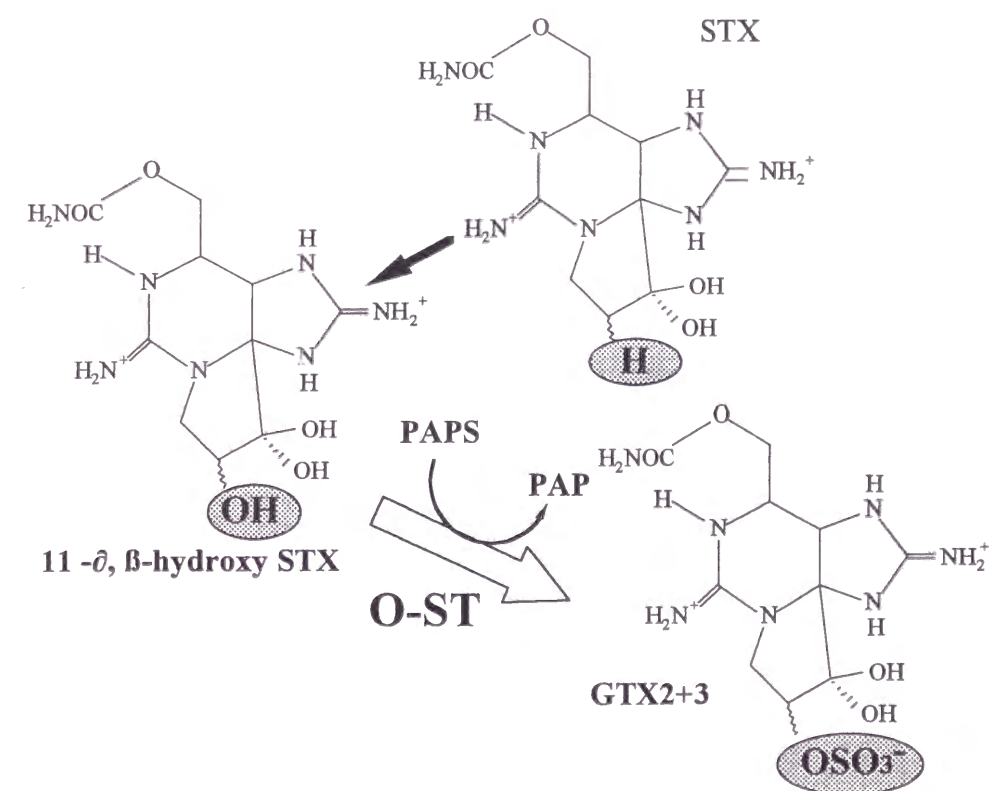


Fig. 1-3 Scheme of the action of O-ST. O-11 sulfation occurs after oxidation of STX. O-ST transfers sulfate group from PAPS to O-11 of 11-Hydroxy STX and produces GTX2+3.

らかになっている(Matsui and Homma 1994, Rikke and Roy 1996, Weinshilboun et al. 1997)。すなわちこの反応は、硫酸抱合と呼ばれ、これらの物質のアミノ基や水酸基に硫酸基を付加することによって、不活化させ、水溶性を高めることによって体外への放出を容易にする。この反応を触媒する硫酸基転移酵素は、細胞質画分に存在し、3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) を硫酸基の供与体として利用する。

このように高等動物における薬物代謝での重要性を考慮すると、硫酸基付加反応が PSP 毒の生合成あるいは代謝において重要な反応過程であると期待される。また、硫酸基付加反応の基質と産物ともに、すでに確立された高速液体クロマトグラフィーを用いた PSP 毒の分離・定量法によって比較的容易に測定できることから(Oshima et al. 1984, 1989)、本研究ではこの PSP 毒に硫酸基を付加する反応を触媒する硫酸基転移酵素に注目した。その結果、スペイン産 *G. catenatum* より STX と GTX2+3 の N21 位に特異的な硫酸基転移酵素 (N-sulfotransferase: N-ST) (Fig.1-2)と 11- α, β -hydroxy STX の O11 位に特異的な硫酸基転移酵素 (O-sulfotransferase: O-ST) (Fig.1-3)を見出した。これらの酵素は、PSP 毒合成系に関与する酵素としては世界で初めて見出されたものであり、これらの酵素の特性を明らかにすることは、PSP 毒の生合成を解明していく上で極めて重要であると思われる。そこで、本研究では、これらの酵素を精製し、性質を詳細に調べ、さらに異なる属の種間でのそれらを比較することを主な目的とした。

第 2 章では、各海域より分離した *A. catenella* と *A. tamarense* の培養株について毒成分の分析を行い、渦鞭毛藻類が有する毒成分の特性を明らかにした。また、各株の毒成分比を各海域ごとにまとめて平均し、毒組成比に地域性が認められるのか否かについて検討を行った。第 3 章では、スペイン産 *G. catenatum* より N-ST の精製を行い、その性質について検討を行った。本株は、一細胞当たりの毒量が *Alexandrium* 属の種にくらべて高く、また、C1-4 や GTX5 および GTX6 などの N-スルフォカルバモイル毒群をきわめて多く含むことから硫酸基転移酵素の活性が高いものと考え、本実験の供試藻として選択した。第 4 章では、高知県産 *A. catenella* より同じく N-ST の精製とその性質の検討を行い、*G. catenatum* の N-ST との比較を行った。さらに、代表的な PSP 原因渦鞭毛藻類における N-ST の分布を調べた。また第 5 章では *G. catenatum* より O-ST の精製を行うとともに、PSP 原因渦鞭毛藻類における O-ST の分布を調べた。第 6 章では、N-ST が、PSP 毒の生合成に直接関与する酵素であるのか否かについて検討を行った。

第 2 章 各海域から分離された *A. tamarense* および *A. catenella* の PSP 毒成分組成比の地域性

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poisoning: PSP) は、有毒渦鞭毛藻をプランクトンフィーダーである二枚貝が摂食し毒化する現象で、毒化した貝を人が食するとふぐ中毒に似た高死亡率の食中毒を引き起こすことから、食品衛生上問題となっている(Shumway 1990, Shumway and Cembella 1993)。PSP の原因藻として知られる渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属の種や *Gymnodinium catenatum* は、世界各地の沿岸域で毎年のように繰り返し発生し、さらに PSP による被害地域も年々広域化している(Hallegraeff 1993, 1995, Rigby and Hallegraeff 1996)。この PSP の広域化については、大型船のバラスト水中有毒渦鞭毛藻のシスト (休眠接合子) が混入することによって、世界中に伝播しているのではとの指摘もなされており、オーストラリアでは湾内でのバラスト水の放出を禁止する手段がとられ(Rigby and Hallegraeff 1996)、わが国にとっても深刻な問題となっている。そのため、PSP 原因生物の伝播を追跡するための、簡便かつ迅速なモニタリング法の確立が望まれている。モノクローナル抗体や、18SrDNA の塩基配列を用いて有毒渦鞭毛藻の同定、検出しようとする試みがなされてきたが、これらの手法は種間識別において極めて有効であるが人為的な伝播を追跡する上で、種内・個体群解析にこれらの手法を用いることは困難であるのが現状である(Adachi et al. 1993 a, b, 1994, 1996)。

一方、これまでに藻体が生産する多様な PSP 毒成分について、1 細胞当たりの総毒量は培養周期や培養条件によって大きく変動するものの、毒成分の組成比はほぼ一定であることが明らかとなっている(Boyer et al. 1986, 1987, Cembella et al. 1987, Kim et al. 1993 a)。さらに、左子らは (1992) は、異なる毒組成比を有する親株間での交配によって得られた F1 株の毒組成比は、親株のいずれかの組成比を示し、また毒組成比が両親性遺伝によって子株に伝達する非常に安定な遺伝形質であることを報告した。そこで本章では、日本各地で分離され、rRNA やモノクローナル抗体を用いた分子分類法によって種の同定が行われた *Alexandrium* 属の培養株について、毒成分を分析し、分離地ごとにまとめて比較を行い、PSP 毒成分組成比が、種内・個体群解析の識別マーカーとなりうるかを検討した。

2-1 材料及び方法

Table. 2-1 Strains of *Alexandrium* species used in this work.

Strains	Origin	Year of isolation	Strains	Origin	Year of isolation
<i>A. tamarense</i>					
OFX151	Ofunatao Bay, Iwate	1984	OFY071	Ofunatao Bay, Iwate	1988
OFY152	"	"	OFX072	"	"
OFX181	"	"	OFY101	"	"
OFY184	"	"	OFX102	"	"
OFX191	"	"	TNY7	Tanabe Bay, Wakayama	1987
OFY192	"	"	TNY8	"	"
OFX052	"	"	TNX10	"	"
HI13	Hiroshima Bay, Hiroshima	1992	TNY11	"	"
HI17	"	"	TNX12	"	"
HI18	"	"	TNX16	"	"
HI22	"	"	TNX22	"	"
HI23	"	"	SE6	Harima-Nada, Kagawa	1981
HI25	"	"	SE7	"	"
HI26	"	"	SE82	"	"
HI27	"	"	Ac91-1	Uranouchi Bay, Kochi	1991
HI28	"	"	Ac91-2	"	"
HIA-1	"	"	Acko-1	"	1988
HID-1	"	"	Acko-2	"	"
At63-1	Harima-Nada, Kagawa	1988	Acko-3	"	"
At63-3	"	"	Acko-5	"	"
At63-4	"	"	Acy-6	Yamakawa Bay, Kagoshima	"
At63-5	"	"	Acy-7	"	"
At4	"	1982	Acy-8	"	"
At9	"	"	Acy-9	"	"
At91-1	"	1992	Acy-12	"	"
At304A	Atsumi Bay, Aichi	1991			
At503A-A	"	1992			

2-1-1-1 *A. tamarense*

1. OF 系株－京都大学農学部水産微生物学研究室で、岩手県大船渡湾において 1984 年と 1987 年に採取した底泥中のシストを発芽させ、分離後、無菌・クローン化した 7 株。
2. HI 系株－南西海区水産研究所の山口峰生氏らによって、広島県広島湾よりクローン株として分離され、分譲していただいた 11 株。
3. 香川県赤潮研究所吉松定昭氏により、香川県・播磨灘よりクローン株として分離され分譲していただいた、At63-1、-3、-4、-5、At4、9 および 91-1 の 7 株。
4. 愛知県水産試験場の石田氏により愛知県三河湾より分離され、譲渡していただいた At304A-A と 503A 株。

2-1-1-2 *A. catenella*

Table 2-2. Composition of SW II m medium

Ingredient	Content/1 ℓ
KNO ₃	72 mg
KH ₂ PO ₄	4.5 mg
Na ₂ -glycerophosphate	10.5 mg
Fe-EDTA	0.5 mg
Vitamin B12	0.6 μg
Biotin	1.0 μg
Thiamine	0.1 mg
Tris aminomethane	1.0 g
Soil extract	30 ml
Sea water	970 ml

pH was adjusted to 7.9 by HCl

1. OF 系株－京都大学農学部水産微生物学研究室で、岩手県大船渡湾において 1987 年に採取した底泥中のシストを発芽させ、分離後、無菌・クローン化した 4 株。
2. TN 系株－京都大学農学部水産微生物学研究室で、和歌山県田辺湾において 1987 年に採取した底泥中のシストを発芽させ、分離後、無菌・クローン化した 7 株。
3. 吉松定昭氏により、香川県播磨灘より分離され譲渡していただいた SE 6、7 および 82 株。同じく吉松氏に分譲していただいた、高知県浦の内湾産 Ac 系株と Acko 系株の計 6 株、および鹿児島県山川湾産の Acy 系 5 株。

培養は全て SWII m 培地 (Table 2-2) を用い、*A. tamarense* については 15℃、*A. catenella* については 20℃ において、明暗サイクル 14L:10D、5000 lux の標準培養条

件下で静置培養を行った。

2-1-2 *Alexandrium* 属藻体からの PSP 毒の抽出

100ml の三角フラスコを用いて、各株を標準培養条件下で培養を行い、対数増殖中期に 1,200 g、5 分間の遠心分離により集藻を行った。SWIIm 培地で洗浄後、0.05 M 酢酸水溶液を 200 μ l 加えて、-20℃ で凍結保存した。全てのサンプルがそろい次第、氷冷下で計 3 分間の超音波破碎を行った。次に 19,500 g、20 分間の遠心分離により得た上清を孔径 0.2 μ m の DISMIC-13cp フィルター (Millipore 社) で濾過し、さらにウルトラフリー C3LGC (Millipore 社) を用いて 8,100 g、20 分間の遠心分離による分子量 10,000 での限外濾過を行い、濾液を HPLC 蛍光分析に供した。

2-1-3 HPLC 蛍光分析

2-1-3-1 HPLC 蛍光アナライザーの構成

PSP 毒の検出には、Oshima ら(1989)によって考案された HPLC を利用したシステムを用いた。HPLC 送液ユニット、蛍光検出器及び記録計にはそれぞれ LC-

6A、RF 535 および CR 6A (島津製作所) または Waters 600E、741 および 470 (Millipore 社) を用いた。蛍光検出器における検出は、340 nm の励起光に対する 390 nm の蛍光を測定することにより行った。酸化剤及び中和液の送液には SPU3.2 (島津製作所) または SSC FLOW SYSTEM 3100 S (Senshu Scientific Co.) を用いた。また、酸化剤の反応コイルとして内計 0.5 mm、長さ 10 m のテフロンチューブを恒温槽中で 65℃ に加温して用いた。また、カラムは Wakosil 5C18 (ϕ 4.6x250mm) (和光純薬) を用いた (Table 2-3)。

2-1-3-2 移動相及び反応液

毒成分を極性の異なる 3 つのグループにわけ、それぞれに対して 3 種類の移動相を調製した (Table 2-3)。A 液は C1-C4 を、B 液は GTX1-5 を、また C 液は STX、neoSTX および dcSTX をそれぞれ分析する際に用いた。カラム通過後の毒成分をアルカリ性下で酸化するために 7mM 過ヨウ素酸溶液を pH 9.01 に調整して用いた。また、反応後、pH を低下させ蛍光物質の蛍光強度を増強させるための酸性溶液は、0.5 N 酢酸溶液を用いた。それぞれの移動相及び反応液の流速は、移動相が 0.8 ml/min、酸化液は 0.4 ml/min、酢酸溶液は 0.4 ml/min とした。

2-1-4 PSP 毒の標準試料

HPLC 蛍光分析用の標準試料 (STX、neoSTX、dcSTX、GTX1-5 および C1-4) は、東北大学の島田泰克先生より譲渡していただいた。本標準試料を毎回の HPLC 分析時に供し、試料に含まれる PSP 毒成分を各標準試料の保持時間から同定した。また、試料と標準試料のピーク面積の比より試料中の PSP 毒量を定量した。

2-2 結果

各株の PSP 毒量および毒組成比を測定した結果を Table 2-4 に示す。まず、細胞あたりの全毒量は、各株間で異なっており、最大で約二倍の開きが認められた。特に、この違いは分離地の異なる株間で大きく、分離地が北であるほど細胞あたりの毒量が高く、逆に南へ行くほど小さい傾向が認められた。一方、分離地が同じ株間では、毒量の差は小さかった。これは、*A. tamarense* と *A. catenella* とともに共通してみとめられる現象であった。ただし、広島湾産の *A. tamarense* だけは、例外的に高い毒量を示した。

各株の PSP 毒成分組成比に注目すると、*A. tamarense* と *A. catenella* とともに C1+2 を主成分としており、種間での差は認められなかった。たとえば、大船渡産の *A. tamarense* と *A. catenella* は、主成分として C1+2 以外にも neoSTX を多く

Table 2-3. Operating conditions for HPLC analysis of PSP toxins

- | |
|---|
| 1. Column : Wakosil 5C8 (ϕ 4.6mm \times 250 mm) |
| 2. Mobile phases : flow rate at 0.8 ml/min |
| (a) for GTX8 (C2), epiGTX8 (C1), C3 and C4 |
| 1mM tetrabutylammonium phosphate adjusted to pH 5.7 with acetic acid |
| (b) for GTX1-5 |
| 2mM sodium 1-heptanesulfonate in 10mM ammonium phosphate (pH 7.2) |
| (c) for neoSTX, dcSTX and STX |
| (b) : acetonitrile = 9 : 1 |
| 3. Oxidizing reagent : flow rate at 0.4 ml/min |
| 7mM periodic acid in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 9.0) |
| 4. Reaction : at 65℃ in 10m Teflon tubing (ϕ 0.5 mm) |
| 5. Acidifying reagent : flow rate at 0.4 ml/min |
| 0.5 M acetic acid |
| 6. Detection : excitation wavelength 330nm, emission wavelength 390nm |

Table. 2-4. Toxin contents^a of *Alexandrium tamarense* and *A. catenella*.

Isolates	Toxins											Total
	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4	NEO	STX	
<i>A. tamarense</i>												
OF151	1.0 (2.0)	-	0.6 (1.1)	13.8 (26.5)	-	0.7 (1.4)	35.4 (67.8)	-	0.6 (1.1)	tr	-	52.2
OF152	4.2 (13.6)	0.1 (0.3)	0.9 (2.9)	25.2 (80.5)	-	-	-	-	-	0.9 (2.7)	tr	31.3
OF181	1.0 (2.7)	0.2 (0.4)	1.5 (4.1)	7.9 (21.0)	-	0.7 (1.9)	25.9 (69.1)	-	-	tr	0.3 (0.7)	37.4
OF184	1.8 (7.8)	-	0.5 (2.1)	5.6 (23.9)	-	0.7 (3.2)	11.9 (50.4)	-	0.2 (0.7)	2.1 (8.8)	0.7 (3.1)	23.5
OF191	0.6 (0.9)	tr	0.2 (0.3)	6.7 (11.0)	-	0.8 (1.4)	33.1 (54.2)	-	0.9 (1.5)	16.9 (27.6)	2.0 (3.2)	66.1
OF192	0.6 (1.3)	0.1 (0.1)	0.2 (0.5)	5.8 (12.1)	-	0.7 (1.5)	29.5 (62.1)	-	0.4 (0.8)	10.3 (21.6)	tr	47.6
OF052	1.0 (1.8)	-	0.6 (1.2)	16.2 (30.1)	-	0.6 (1.2)	26.4 (49.0)	-	1.0 (1.8)	8.2 (15.1)	tr	53.9
At63-1	0.1 (0.8)	-	0.1 (0.8)	2.6 (21.8)	-	0.3 (2.5)	8.0 (67.2)	0.1 (0.8)	0.5 (4.2)	0.2 (1.7)	-	11.9
At63-3	0.4 (1.5)	0.1 (0.4)	tr	4.4 (16.4)	tr	1.7 (6.3)	19.2 (71.6)	0.2 (0.7)	0.4 (1.5)	0.4 (1.5)	-	26.8
At63-4	0.6 (1.8)	tr	0.8 (2.4)	0.1 (0.3)	0.1 (0.3)	8.4 (24.7)	23.9 (70.3)	0.1 (0.3)	tr	-	-	34
At63-5	0.3 (2.0)	tr	0.2 (1.4)	0.7 (4.7)	-	0.6 (4.1)	12.5 (84.5)	tr	tr	0.5 (3.4)	-	14.8
At4	0.2 (1.3)	-	0.1 (0.7)	5.0 (33.6)	tr	tr	8.9 (59.7)	tr	0.2 (1.3)	0.5 (3.4)	-	14.9
At9	0.2 (1.2)	-	tr	3.5 (20.2)	tr	0.4 (2.3)	11.6 (67.1)	0.2 (1.2)	0.9 (5.2)	0.5 (2.9)	-	17.3
At91-1	0.3 (3.3)	tr	0.1 (1.1)	3.9 (42.4)	-	0.2 (2.2)	4.1 (44.6)	0.1 (1.1)	0.3 (3.3)	0.2 (2.2)	-	9.2
HI13	0.7 (5.1)	-	0.5 (3.6)	2.5 (13.2)	0.1 (0.7)	0.2 (1.4)	8.8 (64.2)	tr	tr	0.9 (6.6)	-	13.7
HI17	1.8 (3.4)	-	0.8 (1.5)	13.1 (24.6)	-	0.4 (0.8)	13.4 (25.1)	0.1 (0.2)	0.8 (1.5)	22.7 (42.6)	0.2 (3.8)	53.3
HI18	1.0 (2.4)	tr	2.2 (5.3)	5.8 (14.0)	-	0.5 (1.2)	27.9 (67.2)	1.0 (2.4)	-	3.0 (7.2)	0.1 (0.2)	41.5
HI22	0.6 (2.0)	-	0.7 (2.3)	7.7 (25.5)	-	0.3 (1.0)	14.0 (46.4)	0.9 (3.0)	1.3 (4.3)	4.7 (15.6)	-	30.2
HI23	0.6 (1.6)	-	0.6 (1.6)	2.3 (6.1)	0.6 (1.6)	0.4 (1.1)	25.4 (67.9)	0.7 (1.9)	-	6.8 (18.2)	-	37.4
HI25	2.9 (6.2)	tr	0.2 (0.4)	19.7 (42.0)	-	0.6 (1.3)	17.0 (36.2)	0.1 (0.2)	0.8 (1.7)	5.5 (11.7)	0.1 (0.1)	46.9
HI26	1.4 (2.9)	tr	3.1 (6.5)	12.7 (26.7)	-	0.6 (1.3)	15.6 (37.8)	0.1 (0.2)	0.1 (0.2)	13.5 (28.4)	0.5 (1.1)	47.6
HI27	2.6 (7.4)	-	0.1 (0.3)	7.8 (22.3)	-	0.5 (1.4)	16.9 (48.3)	0.1 (0.3)	0.4 (1.1)	6.3 (18)	0.3 (0.9)	35.0
HI28	3.6 (4.9)	0.1 (0.1)	7.0 (9.6)	23.8 (32.7)	-	1.4 (1.9)	30.8 (42.8)	-	-	5.9 (8.1)	0.2 (0.3)	72.8
HIA-1	0.2 (0.6)	-	0.3 (0.9)	3.1 (8.9)	-	0.9 (2.6)	20.8 (60.6)	0.1 (0.3)	tr	9.3 (26.8)	-	34.7
HID-1	1.2 (3.3)	-	1.1 (3.1)	6.4 (17.8)	-	0.4 (1.1)	18.4 (51.3)	0.2 (0.6)	0.8 (2.2)	7.2 (20.1)	0.2 (0.6)	35.9
At304A-A	-	tr	0.3 (1.7)	-	-	0.4 (2.3)	16.7 (96.5)	-	-	-	-	17.3
At503A	-	-	0.2 (1.0)	-	-	0.6 (2.9)	20.1 (96.1)	-	-	-	-	20.9

Table 2-4. Continued

Isolates	Toxins											Total
	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4	NEO	STX	
<i>A. catenella</i>												
OF071	-	-	tr	-	0.7 (1.4)	0.4 (0.8)	13.3 (28.1)	-	0.1 (0.2)	31.9 (67.5)	0.9 (2.1)	47.3
OF072	-	-	0.1 (0.4)	-	0.3 (1.4)	0.3 (1.4)	6.9 (33.2)	-	-	10.4 (50.0)	2.8 (13.5)	20.7
OF101	-	-	0.1 (0.4)	tr	tr	1.3 (5.3)	14.1 (57.6)	-	-	7.5 (30.6)	1.5 (6.1)	24.5
OF102	-	-	0.6 (0.9)	-	0.2 (0.4)	0.3 (0.6)	9.3 (15.9)	-	-	46.5 (79.4)	1.6 (2.8)	58.5
TN7	0.2 (1.2)	-	0.1 (0.4)	3.5 (17.8)	8.9 (45.1)	0.3 (1.7)	5.5 (27.6)	-	0.7 (3.3)	0.2 (3.3)	0.2 (3.3)	19.8
TN9	0.3 (1.5)	-	0.1 (0.3)	0.9 (5.2)	3.1 (17.8)	0.5 (3.1)	8.6 (48.9)	-	0.6 (3.1)	-	-	17.6
TN10	tr	-	tr	1.7 (5.2)	6.1 (18.4)	0.4 (1.1)	23.7 (70.9)	-	1.3 (3.9)	-	tr	33.5
TN11	0.2 (1.7)	-	tr	1.6 (13.2)	2.4 (19.1)	0.2 (1.7)	6.5 (51.7)	-	1.3 (10.3)	tr	0.3 (2.3)	12.6
TN12	tr	-	tr	1.7 (10.7)	3.1 (19.5)	0.2 (1.3)	9.3 (58.5)	-	1.1 (6.9)	-	0.6 (3.8)	15.9
TN16	-	-	tr	1.5 (11.2)	1.7 (12.7)	0.3 (2.2)	8.9 (66.4)	-	1.0 (7.5)	-	-	13.4
TN22	tr	-	tr	2.4 (13.8)	6.4 (36.8)	0.5 (2.9)	7.3 (42.0)	-	0.8 (0.8)	-	tr	17.4
Ac91-1	1.9 (17.1)	-	tr	2.3 (20.7)	-	tr	5.2 (46.9)	-	1.7 (15.3)	tr	-	11.1
Ac91-2	0.1 (0.8)	-	tr	1.6 (13.8)	-	0.2 (1.7)	7.2 (61.5)	0.2 (1.7)	2.4 (20.5)	-	-	11.7
SE6	-	-	0.1 (0.4)	1.0 (4.3)	5.6 (23.8)	0.5 (2.1)	15.3 (65.1)	-	1.1 (4.7)	-	-	23.5
SE7	-	-	0.1 (0.4)	1.2 (5.1)	5.1 (21.7)	0.4 (1.7)	10.8 (46.0)	-	0.5 (2.1)	5.5 (23.4)	-	23.5
SE82	tr	-	tr	0.5 (4.7)	0.8 (7.5)	0.1 (1.0)	7.1 (67.0)	-	0.6 (5.7)	1.5 (14.2)	-	10.6
Acko1	3.1 (18.7)	-	tr	-	-	tr	13.5 (81.3)	tr	tr	-	-	16.6
Acko2	0.7 (5.9)	-	tr	1.7 (14.3)	1.2 (10.1)	0.2 (1.7)	5.7 (47.9)	0.3 (2.5)	2.1 (17.6)	-	-	11.9
Acko3	1.3 (7.5)	-	tr	4.5 (26.0)	tr	tr	9.4 (54.3)	0.2 (1.2)	1.9 (11.0)	-	-	17.3
Acko5	0.1 (0.5)	-	tr	-	0.7 (3.6)	0.4 (2.1)	18.2 (93.8)	-	-	-	-	19.4
Acy-6	tr	tr	tr	2.5 (26.0)	-	0.1 (1.0)	3.5 (36.4)	0.3 (3.1)	3.1 (32.3)	0.1 (1.0)	-	9.6
Acy-7	1.0 (6.0)	-	tr	3.8 (22.6)	-	0.6 (3.6)	7.1 (42.3)	0.2 (1.2)	3.0 (17.9)	1.1 (6.5)	-	16.8
Acy-8	0.1 (1.1)	tr	tr	1.8 (19.6)	-	0.7 (7.6)	4.8 (52.2)	0.1 (1.1)	1.5 (16.3)	0.2 (2.2)	-	9.2
Acy-9	0.1 (1.3)	-	tr	1.4 (18.7)	-	0.1 (1.3)	3.3 (44.0)	0.1 (1.3)	2.3 (30.7)	0.2 (2.7)	-	7.5
Acy-12	1.8 (8.4)	-	tr	8.5 (39.7)	-	0.2 (0.9)	5.2 (24.3)	0.2 (0.9)	4.5 (21.0)	1.0 (4.7)	-	21.4

^a All results are shown in f mole/cell (% composition of total toxin)
; tr, trace level ; -, not detected.

含み、非常に似た成分を有していた。PSP 毒組成比の差は、種間ではなくむしろ分離地のことなる株間のあいだで認められ、分離地が北であるほど比毒性の高いカルバメイト毒群 (neoSTX や GTX1-4) を多く含み、分離地が南へ行くほど N-スルフォカルバモイル毒群 (C1-4, GTX5,6) の組成比が高い傾向が認められた。そこで、各株の PSP 毒組成比を分離地ごとにまとめて平均し、種内での毒組成比の比較を行った (Fig. 2-1)。*A. tamarense* では、すべての株で C1+2 が主成分として認められたが、特に愛知県産の株では、C1+2 の割合が約 95%にも達し、他の三つの地域の株とは明らかに異なっていた。また、大船渡湾産と広島湾産の株はともに C1+2 と neoSTX を主成分とし非常に似た毒成分組成比を示した。播磨灘産の株は neoSTX をほとんど含まないことからこれらと区別することが可能であった。*A. catenella* でも、すべての株で C1+2 を主成分としているが、大船渡湾産の株は約 60%と neoSTX の割合が非常に高く他の地域の株と異なる毒組成比を有した。田辺湾産の株と播磨灘産の株は GTX5 が認められたが、田辺湾産の株には neoSTX と STX が含まれることから播磨灘産の株と識別することができた。また、山川湾産と浦の内湾産の株の PSP 毒成分比を比較すると、山川湾産の株には neoSTX が認められることから、両者を区別することができた。

2-3 考察

本実験では、日本全国の各海域より分離された *A. tamarense* 27 株 (大船渡産 7 株、広島湾産 11 株、播磨灘産 7 株、渥美湾産 2 株) と *A. catenella* 25 株 (大船渡湾産 4 株、田辺湾産 7 株、播磨灘産 5 株、浦の内湾産 4 株、山川湾産 5 株) のすべての株について PSP 毒量および毒成分組成比を測定した。今回用いたすべての株は形態学的分類に従い種が決定されている。しかしながら上記 2 種と *A. fundyense* は形態が酷似しており、北米では多くの混乱が生じている。そこで本実験で用いられた *A. tamarense* OF 系株の全株、HIA-1、-28、At4、および At304A、-503A-A、また *A. catenella* OF 系株、TN 系株、Acy-2 および Acko3 については、5.8SrDNA および隣接する内部スペーサー (ITS 1, 2) の塩基配列を用いた系統解析 (Adachi et al. 1996) と、両種に特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫学的手法によっても種の確認が行われ (Sako et al. 1993, Adachi et al. 1994)、形態分類と一致した結果が得られている。

分子分類によって種が明確になった日本産の株を用いて、一細胞あたりの PSP 毒量を測定したところ、*A. tamarense* と *A. catenella* とともに分離地ごとに差異が認められた。このような分離地による毒量の差異は Maranda ら (1985) と Cembella ら (1987) によって報告されている。特に Maranda らは、北米の大西洋沿岸の各地

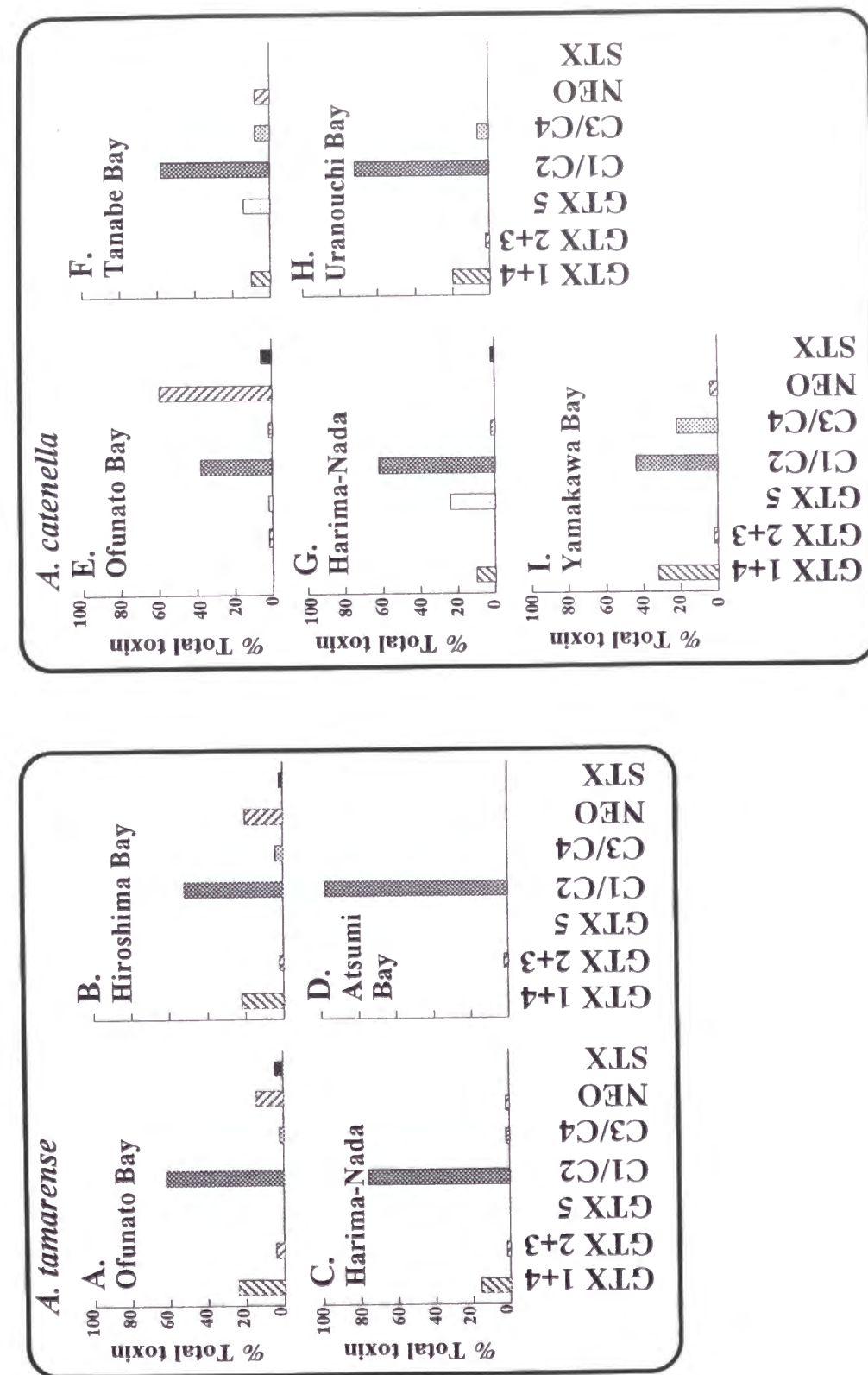


Fig. 2-1 Comparison of the average toxin composition (as % total toxin) of *A. tamarense* (A, B, C, D) and *A. catenella* (E, F, G, H, I) isolated from different regions. A, 6 isolates from Ofunato Bay; B, 10 isolates from Hiroshima Bay; C, 7 isolates from Harima-Nada; D, 2 isolates from Atsumi Bay; E, 4 isolates from Ofunato Bay; F, 7 isolates from Tanabe Bay; G, 3 isolates from Harima-Nada; H, 6 isolates from Uranouchi Bay; I, 5 isolates from Yamakawa Bay

で分離された *A. tamarense* の PSP 毒を測定したところ、分離地が北に行くにつれ一細胞あたりの毒量が高くなり、また毒成分についても北へ行くほど比毒性の高いカルバメート毒群の比率が高くなることを指摘しており、今回の実験においても同様の結果を得た。日本における PSP による被害は、当初、北海道から東北にかけて顕在化しており(Oshima et al. 1982, Hashimoto and Noguchi 1976)、これは北日本で発生する *Alexandrium* 属の毒量が高くかつ比毒性が高い成分を多く含むことに起因した可能性がある。広島湾産の *A. tamarense* 株が例外的に毒量が高く、また毒組成が北日本地域で分離された株の毒組成と似ているのは、カキの養殖に用いる稚貝を東北地方から仕入れており、この輸送とともに本種が運ばれ定着した可能性を示唆するものであるが、今後、個体群の識別に可能な分子識別法の確立を待たねばならない。

次に、各株の PSP 毒成分比を各地域ごとにまとめて平均し、比較したところ、各海域ごとに特徴的な毒組成比を示すことが示された。ただし、大船渡湾産の *A. tamarense* と *A. catenella* の毒成分比のように、異なる種間でも非常に似た毒組成比を示すものもあり(Fig. 2-1)、種間の識別は不可能であった。これまでに、無菌・クローンの *Alexandrium* 属の株を用い毒成分比の測定を行われ、各増殖段階で一細胞あたりの PSP 毒量は変化するもののその組成はほぼ一定であることが明らかとなっている(Kim et al. 1993a)。さらに、*Alexandrium* 属がヘテロタリックな有性生殖を行うことを利用して PSP 毒組成の異なる親株同士を交配することによって得られた子株の毒組成を分析し、親株と同じ PSP 毒組成比を有する子株がそれぞれ 1 : 1 の割合で出現し、毒組成は両親性の遺伝様式に従うことも報告されている(Sako et al. 1992)。このように PSP 毒組成比は非常に安定な遺伝形質であり、毒成分比に地域性が認められることから、PSP 毒組成比が個体群の識別マーカーになりうる可能性が示唆された。また、このような例は、*G. catenatum* においても報告されており、カルバモイル基が脱水された 13-deoxydecarbamoylSTX が、オーストラリアの株に特徴的であり、他の地域で分離された株と異なることが示されている(Oshima 1993a)。その一方で、rRNA 遺伝子の塩基配列やモノクローナル抗体を用いた有毒種の分子生物学的あるいは生化学的手法を用いた分類法も確立されつつあるが(Adachi et al. 1993a, b, 1994, 1996)、これらの手法は種間識別には非常に有効であるが、種内解析は困難であるのが現状である。そこで、PSP 毒成分比解析とこれらの手法を総合的に用いることでより正確に有毒種の人為的伝播を追跡することが可能になるのではないかと期待される。しかしながら、高知県浦の内湾産 *A. catenella* Acko5 株においてみられるように、同じ地域で分離された中にも他の株とは PSP 毒組成比が全く異なる株が認められた(Table 2-4)。このように、同じ海域内にも PSP 毒組成比

に関してヘテロな個体群が混在している可能性もあり、一つの海域に対してある一定数以上の株を分離し、PSP 毒組成比を測定する必要があると思われる。さらに今後の課題として、同一海域で経年的に調査を行い、毎年発生する *Alexandrium* 属の種や *Gymnodinium catenatum* の PSP 毒組成比が一定であるのか、あるいは年毎に変化するのかを明らかにする必要があると思われる。

また今回の実験から、藻体の有する PSP 毒成分には、N21 位に硫酸基が付加した C1-4 や GTX5、および GTX6 などの N-スルフォカルバモイル毒群、あるいは 011 位に硫酸基を付加した GTX1-4 などの成分が多く含まれることが明らかとなった。これは、以前に *Alexandrium* 属の種や *G. catenatum* について調べられた PSP 毒組成についてもいえる(Kim et al. 1993a, b, Sako et al. 1995, Oshima et al. 1990, 1993 a, b)。また、硫酸基付加反応は、哺乳類において、ステロイドホルモンやフェノールなどの生理活性物質の解毒および代謝に関わっていることが明らかになっており(Matsui and Homma 1994, Rikke and Roy 1996, Weinshilboum et al. 1997)、硫酸基付加反応が PSP 毒の生合成あるいは代謝において重要な反応過程であると推測される。

2-4 摘要

A. tamarese 27 株(大船渡湾産 7 株、広島湾産 11 株、播磨灘産 7 株、渥美湾産 2 株)、*A. catenella* 25 株(大船渡湾産 4 株、田辺湾産 7 株、播磨灘産 5 株、浦ノ内湾産 4 株、山川湾産 5 株)の全ての株について毒成分を測定したところ、分離地が北であるほど細胞あたりの毒量が高く、逆に南へ行くほど低い傾向が認められた。PSP 毒組成比の差は、種間では認められなかったが、種内において分離地の異なる株間で認められ、広島湾産の *A. tamarese* を除き分離地が北であるほど比毒性の高いカルバメイト毒群(neoSTX や GTX1-4)を多く含み、分離地が南へ行くほど N-スルフォカルバモイル毒群(C1-4、GTX5,6)の組成比が高い傾向が認められた。両種について、PSP 毒組成比をそれぞれ分離地ごとにまとめ、比較を行ったところ、各地域ごとに固有の毒組成比が存在することが示された。これらの株について rRNA やモノクローナル抗体を用いた分子分類が行われ、同種であること認められていることから、藻体の持つ毒組成比を種内における個体群解析に用いることが可能であることが示唆され、今後、毒組成比が有毒種の人為的伝播を追跡するためのマーカーとして利用されることが期待される。また、いずれの株においても基本骨格の C11 位や N21 位に硫酸基を有する毒成分を多く含むことから、硫酸基転移反応が PSP 毒の生合成において重要な反応の一つであると考えられた。

第3章 *Gymnodinium catenatum* からの PSP 毒の N21 に
硫酸基を付加する酵素 (N-sulfotransferase: N-ST) の精製とその性質

これまで、PSP 毒の生合成について、本毒を生産する藍藻 *Aphanizomenon flos-aquae* について RI 標識した物質の取り込み実験が行われ、PSP 毒基本骨格がアルギニン、メチオニンおよび酢酸に由来することが明らかになっている (Shimizu 1993,1996)。しかし、その中間体については全く知見が得られておらず、PSP 毒の生合成系酵素群を解明することは現在のところ極めて困難である。ところで、有毒渦鞭毛藻類の有する PSP 毒には、N21 位に硫酸基が付加した C1-4 や GTX5 および GTX6 などの N-スルフォカルバモイル毒群、あるいは O11 位に硫酸基を付加した GTX1-4 などの成分が多く含まれる (Oshima 1990,1993 a,b, Kim et al. 1993 a,b, Sako et al. 1995)。高等動物における薬物代謝での硫酸化の重要性を考慮すると、硫酸基付加反応が PSP 毒の生合成あるいは代謝において重要なステップであると推測される。さらに、硫酸基付加反応の基質と産物ともに、すでに確立された高速液体クロマトグラフィーを用いた PSP 毒の分離・定量法によって比較的容易に測定できることから (Oshima et al.1984, 1989)、硫酸基転移酵素に注目し、その分離と精製を試みた。まず、*A. catenella* および *A. tamarense* の培養株について、PSP 毒に対して特異的な硫酸基転移酵素 (Sulfotransferase: ST) の検索を行ったが、これらの種からは微弱な活

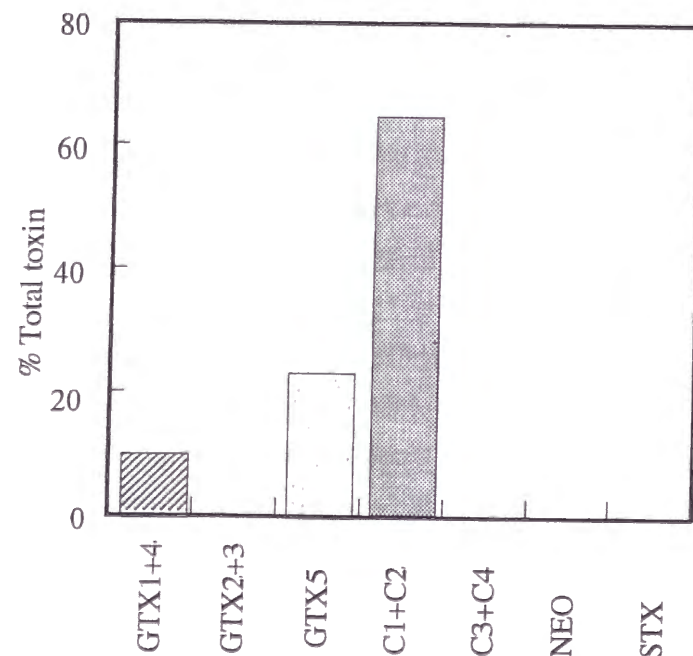


Fig. 3-1. Toxin Composition of *Gymnodinium catenatum* GC21V

性しか認められなかった。そこで、*Alexandrium* 属に比べ、一細胞当たりの毒量が高く、C11 位あるいは N21 位に硫酸基を有する GTX5+6 や C1-4 の毒成分比が高いスペイン産 *Gymnodinium catenatum* GC21V 株 (Fig. 3-1) を用いて検索を行ったところ、STX と GTX2+3 の N21 位に硫酸基を転移し、それぞれ GTX5 と C1+2 を生じる活性の存在を見いだした (Fig.1-2)。

G. catenatum は無殻で連鎖群体をつくる独立栄養性の渦鞭毛藻であり、日本、メキシコ、スペイン、ポルトガル及びオーストラリアでその分布が確認されている。国内では、山口県仙崎湾、京都府久美浜湾及び瀬戸内海播磨灘南部で観察されている。スペイン、メキシコで PSP が発生した際に、本種がみられたことから有毒種であると考えられていたが、後に本種が毒を産生することが確認され、*Alexandrium* 属とともに PSP の原因藻として注目されるようになった (Oshima et al. 1993a,b)。

本章では、スペイン産 *G. catenatum* より本酵素の精製を行い、性質を検討した。なお、本論では以下本酵素を N-ST とする。

3-1 材料及び方法

3-1-1 *Gymnodinium catenatum* GC21V 株の培養及び集藻

以下の実験に用いた株は、スペインのピゴ湾で 1969 年に採取され (Reguera and Oshima 1990)、久保により無菌・クローン化した後、継代培養されているものである。培養は全て、SWIIm 培地 (Table 2-2) を用い、20°C、明暗サイクル 14L:10D、5000 Lux の標準培養条件下で行った。また、大量培養には試験管で培養されている保存株より SWIIm 培地 2 l を入れた駒型フラスコに接種し標準培養条件下で培養を行った。対数増殖中期の藻体を孔径 20 μm のナイロンネットで濾過した後、遠心管に移して、5 分間、1,200g の遠心分離により集藻した。さらに、集めた藻体を滅菌海水で二回洗浄した後、液体窒素中で保存した。

3-1-2 酵素活性の測定法

酵素反応はエッペンドルフチューブを用いて、1 μM GTX2+3 (5 μl)、10mM PAPS (10 μl)、100mM MgCl₂ (4 μl)、200mM リン酸緩衝液 KH₂PO₄-Na₂PO₄ (pH 6.0) (31 μl) と酵素液 50 μl を加えて全量を 100 μl とし、30°C、1 時間の反応を行った。反応は、100 μl の 0.5 M 酢酸を添加して停止した。反応後の試料をウルトラフリー C3LGC (Millipore 社) を用いて分子量 10,000 の限外濾過を行い、濾液を HPLC 蛍光分析 (Oshima et al. 1989) に供し、反応産物である C1+2 を定量した。また、酵素液の代わりに緩衝液 A (50mM Tris-HCl, pH 8.0) を加

えて反応を行ったものを対照とした。なお、N-ST 活性は、タンパク質 1mg 当たりで 1 時間に生成された C1+2 量 ($\mu\text{M} / \text{h} \cdot \text{mg}$)である比活性で表わした。

3-1-3 N-ST の諸性質の検討

3-1-3-1 基質特異性

3-1-2 の反応系に、他生物の硫酸基転移酵素の基質として報告されている化合物 p-Nitrophenol、Naphtylamine、L-Tyrosine、L-Tyrosine methyl ester、L-tyramine、UDP-N-Acethylgalactosamine、Dopamine、Epinephrine、Estron をそれぞれ基質である GTX2+3 の 20 倍量 (0.02mM) 添加し、N-ST 活性に与える影響を調べた。また N-ST の基質の代表的な類似体である GTX1+4、neoSTX、dcGTX2+3 および dcSTX をそれぞれ基質である GTX2+3 の 2 倍量添加した場合についても検討した。

3-1-3-2 基質親和性

3-1-2 の反応系で GTX2+3 の終濃度のみを 147M 、 73.5M 、 36.75M 、 14.7M 、 11.025M 、 7.35M 、 3.675M 、 1.47M に変化させて活性を測定し、両逆数プロットにより GTX2+3 に対する K_m 値を求めた。同様に PAPS の終濃度のみをそれぞれ 3mM 、 1.5mM 、 0.75mM 、 0.3mM 、 0.225mM 、 0.150mM 、 0.075mM 、 0.030mM に変化させ、GTX2+3 を基質にしたときの PAPS に対する K_m 値を求めた。

また同様に STX の終濃度のみを 30M 、 15M 、 7.5M 、 3.0M 、 1.5M に変化させて STX に対する K_m 値を求めた。また STX を基質として用い (0.03mM)、PAPS の終濃度のみを 3mM 、 1.5mM 、 0.75mM 、 0.3mM に変化させて STX を基質にしたときの PAPS に対する K_m 値を求めた。

3-1-3-3 硫酸基供与体特異性

3-1-2 の反応系において、硫酸基供与体として PAPS の代わりに終濃度 0.1mM になるように Adenosine 3'-phosphate 5'-sulfate (APS)、p-Nitrophenyl sulfate (PNS) または 4-Methylumbelliferyl sulfate (4MUS)を加えた場合について検討を行った。

3-1-3-4 至適反応温度

3-1-2 の反応系において、反応温度のみ $15-40^\circ\text{C}$ の間で 5°C ずつ変化させ N-ST の活性を測定した。

3-1-3-5 至適反応 pH

3-1-2 の反応系において、 200mM リン酸緩衝液 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0)の代わりに pH 4-10 の範囲で以下に示す緩衝液を用いて pH を調整し、活性を測定した。用いた緩衝液は、pH 4-6 は、 200mM 酢酸緩衝液、pH 5-8 は 200mM リン酸緩衝液、pH 8-10 は 200mM Tris 緩衝液を用いた。

3-1-3-6 Mg^{2+} およびその他の 2 価金属陽イオンの要求性

3-1-2 の反応系において Mg^{2+} の濃度のみ $0-10\text{mM}$ の範囲で変化させ、その活性を測定した。また、 Mg^{2+} の代わりに終濃度 5mM になるように Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} または Zn^{2+} を加えた場合についても検討を行った。

3-1-3-7 PAP の影響

3-1-2 の反応系において、adenosine 3',5'-diphosphatePAP を終濃度 $0-10\text{mM}$ の範囲で変化させて添加し、N-ST 活性 に及ぼす効果を測定した。

3-1-3-8 塩の影響

3-1-2 の反応系において NaCl および KCl を終濃度 0.3 、 0.5 、 1.0M となるように添加しその活性を測定した。

3-1-4 N-ST の精製

3-1-4-1 粗酵素液の調整

精製には、約 200 l の培養から集藻し、液体窒素中で凍結保存しておいた約 23 g の藻体を用いた。藻体を湿重量と同量の緩衝液 A (50mM Tris-HCl, pH 8.0) に懸濁し、氷冷下で計 5 分間の超音波破碎を行った。細胞質画分を得るため $100,000\text{g}$ 、30 分間の超遠心分離を行い、得られた上清に硫酸アンモニウムを 80% 飽和になるように加え、氷冷下で攪拌しながら塩析を行った。次に $25,000\text{g}$ 、30 分間の遠心分離によって得た沈殿を緩衝液 A に溶解し、同緩衝液に対して一晚透析を行い粗酵素液を調整した。

3-1-4-2 DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー

緩衝液 A に懸濁した DEAE-Cellulose DE52 (Whatman 社) を XK26/40 カラム (Pharmacia 社) に充填 ($\phi 26 \times 150\text{ mm}$) し、2 倍量の緩衝液 A で平衡化した。このカラムに粗酵素液を流速 1 ml/min で添加し、緩衝液 A で洗浄した。その後、 0 、 0.1 、 0.2 、 0.3 および 1.0M NaCl を含む緩衝液 A のステップワイズにより試料を溶出した。活性画分を集めて緩衝液 B (50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.0)に対して透析し、次のカラムの試料とした。

3-1-4-3 Blue Toyopearl アフィニティークロマトグラフィー

緩衝液 B に懸濁した AF-Blue Toyopearl 650ML (東ソー社) を C10/10 カラム (φ10×10mm) に充填し、2 倍量の緩衝液 B で平衡化した。このカラムに試料を流速 0.1 ml/min. で添加した後、緩衝液 B でカラムを洗浄した。試料の溶出は、1ml/min の流速で 0、0.1、0.2、0.3 および 2M KCl を含む緩衝液 B のステップワイズにより行った。活性画分を集めて緩衝液 A に対して透析し、次のカラムの試料とした。

3-1-4-4 Mono Q カラムクロマトグラフィー

FPLC System に Mono Q HR5/5 カラムを装着し、5 倍量の緩衝液 A で平衡化した。スーパーラップを用いて試料を流速 0.5 ml/min で添加し、緩衝液 A でカラムを洗浄した。その後、0-0.3 M の NaCl の濃度勾配により試料の溶出を行った。活性画分を集めて Molcut 3LC (Millipore 社) で 2 倍に濃縮した。さらに、ウルトラフリー C3LGC によって最終的に 10 倍に濃縮して次のカラムの試料とした。

3-1-4-5 Superdex 200HR カラムクロマトグラフィー

FPLC System に Superdex 200HR ゲル濾過カラムを装着し、2 倍量の緩衝液 C (200mM Tris-HCl, pH 8.0) で平衡化した。試料を流速 0.5 ml/min で添加し、緩衝液 C で試料の溶出を行った。また、分子量測定用スタンダードタンパク質 (Pharmacia 社) を用いて検量線を作成し、分子量を測定した。

3-1-5 Native-PAGE ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Superdex 200HR カラムクロマトグラフィーより得られた活性画分を試料用緩衝液 [10mM Tris-HCl, 20% Glycerol (pH 6.8)] で置換し、12.5% Native-PAGE (140×140×1 mm) の 2 本のレーンに供した。泳動は 5°C 下で 10mA の定電流で行った。一方のレーンについて、5mm 幅でゲルを切り出した。切り出したゲルを 3-1-2 に示す反応液に浸し、細かく砕いた後、シェーカーを用いて振盪させながら、25°C で 4 時間反応させ活性を測定した。また、もう一方のレーンについては、クマシーブリリアントブルーで染色しタンパク質バンドを検出した。

3-1-6 SDS-PAGE ゲル電気泳動

各精製段階の活性画分 10μl に試料用緩衝液 [10mM Tris-HCl, 1% SDS, 1%

2-mercaptoethanol, 20% glycerol (pH 6.8)] 300μl を加え、ウルトラフリー-C3LGC を用いて 10μl に濃縮した。その後、3 分間、95°C の熱処理を行い、10%SDS-PAGE に供した。泳動は、30 mA の定電流で行い、泳動後クマシーブリリアントブルーで染色しタンパク質バンドを検出した。同時に、分子量マーカー (Pharmacia 社) を泳動し、泳動距離からサブユニットの分子量を推定した。

3-1-7 タンパク質の定量

タンパク質の定量は、プロテインアッセイキット (Bio-Rad 社) を用いた。牛血清アルブミンを標準タンパク質として検量線を作成し、これをもとに試料中のタンパク質を定量した。

3-2 結果

3-2-1 *Gymnodinium catenatum* GC21V からの N-ST の精製

本酵素の精製のまとめを Table 3-1 に示した。N-ST の精製には、硫酸分画、DEAE-cellulose、AF-Blue Toyopearl 650ML、Mono Q HR5/5 および Superdex 200HR の各種カラムを用いた。各カラム操作におけるタンパク質と N-ST 活性の溶出パターンを Figs.3-2~5 に示す。本酵素の活性は広い範囲の硫酸濃度の飽和によって沈殿してくることから、N-ST の精製では、20-80% の硫酸飽和による分画を行い、N-ST 活性を含む沈殿を得た。DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーでは、NaCl のステップワイズによって試料の溶出を行った。その結果、N-ST の活性は 0.1 M NaCl によって溶出した (Fig.3-2)。活性画分

Table 3-1. Summary of purification of the N-ST from *G. catenatum* GC21V.

Preparation	Total protein (mg)	Total activity (μM C1+2/h)	Yield (%)	Specific activity (μM C1+2/h•mg)	Purification factor (fold)
Crude extract	550	-	-	-	-
20-80% (NH ₄) ₂ SO ₄	483	-	-	-	-
DEAE-cellulose DE52	128	160	100	1.2	1
Blue Toyopearl 650 ML	5.1	230	144	45	37
FPLC Mono Q	0.76	6.7	4.3	8.8	7
FPLC Superdex 200HR	0.035	2.3	1.5	67	54

-, not analyzed.

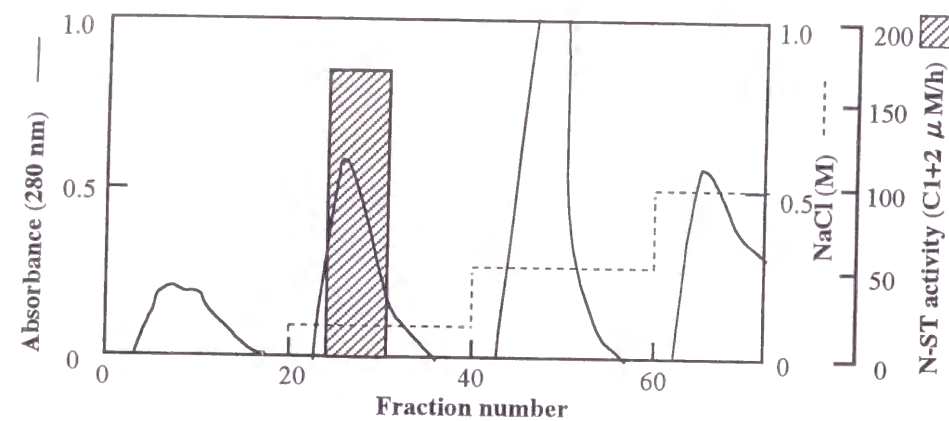


Fig. 3-2. DEAE-cellulose column chromatography of N-ST from *G. catenatum* GC21V. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate was dissolved in buffer A and applied to a DEAE-cellulose column equilibrated with buffer A. The column was eluted by step-wise of buffer A containing 0.1M, 0.2M and 0.5 M NaCl.

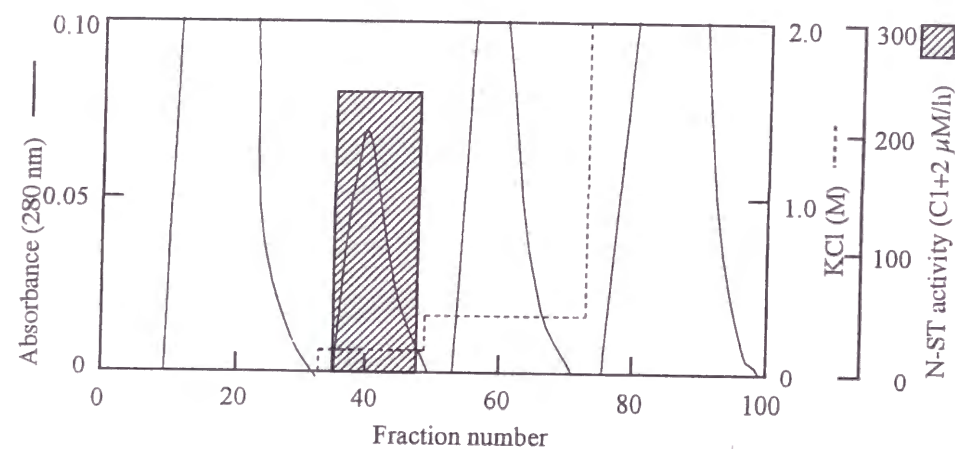


Fig. 3-3. AF-Blue Toyopearl 650ML column chromatography of N-ST from *G. catenatum* GC21V. The active fraction on DEAE-cellulose was applied to a AF-Blue Toyopearl 650ML column equilibrated with buffer B. The column was eluted by step-wise of buffer B containing 0.1M, 0.3M and 1.0 M KCl.

について、AF-Blue Toyopearl 650ML によるアフィニティークロマトグラフィーを行ったところ、非吸着画分には本酵素活性は認められず、0.1 M KCl で溶出する画分に活性を回収した(Fig.3-3)。続く Mono Q では、0.1-0.2 M NaCl で本酵素が溶出した(Fig.3-4)。また、Superdex 200HR によるゲル濾過では、15 から 17 ml に溶出する画分に本酵素活性を回収した(Fig. 2-5)。今回の精製操作により、収率は 1.5%と低いものの、約 54 倍にまで精製が進んだ(Table3-1)。そこで、精製度を確認するために Superdex 200HR カラムクロマトグラフィー

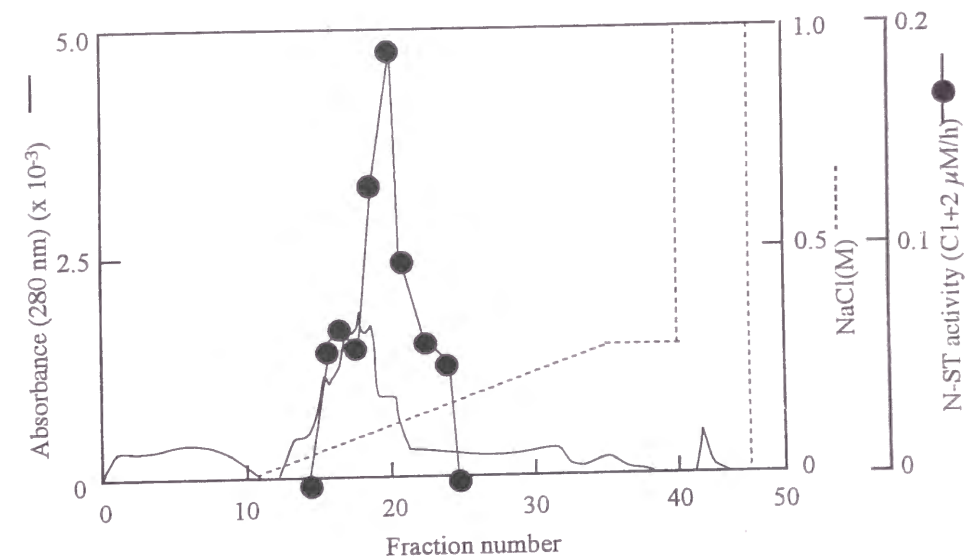


Fig. 3-4. Mono Q column chromatography of N-ST from *G. catenatum* GC21V. The active fraction on AF-Blue Toyopearl column was applied to a MonoQ column equilibrated with buffer A. The column was eluted by linear gradient of NaCl concentration from 0-0.3 M in buffer A.

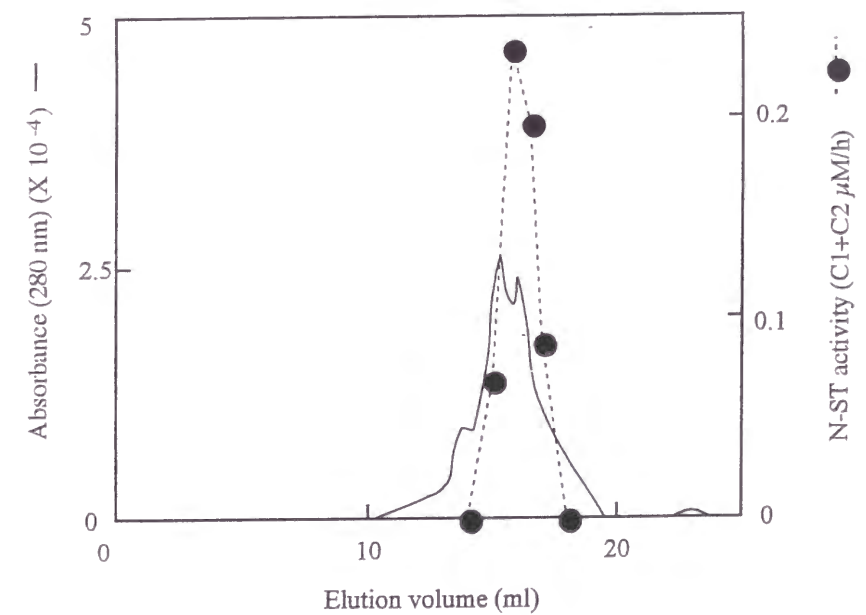


Fig. 3-5. Superdex 200HR column chromatography of N-ST from *G. catenatum* GC21V. The active fraction on Mono Q column was applied to a Superdex 200HR column equilibrated with buffer A.

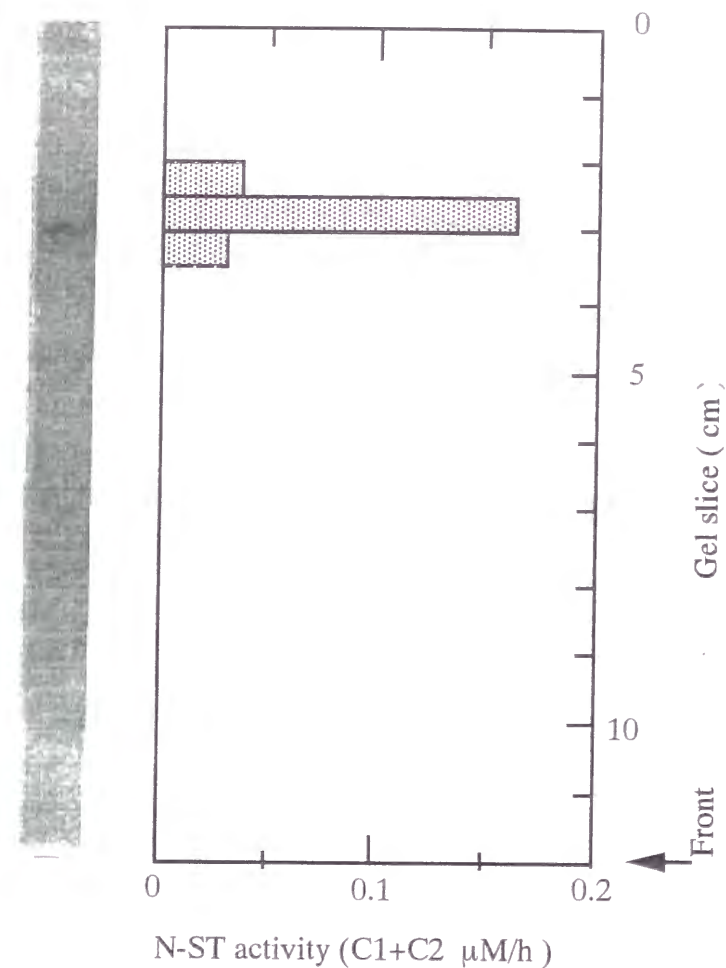


Fig.3-6 Native-PAGE of N-ST from *G. catenatum* (left) and N-ST activity of the sliced gels (right). Purified N-ST was subjected to 12.5% PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R

後の活性画分について、Native-PAGE を行った (Fig3-6)。その結果、一本のタンパク質のバンドが得られ、また同時に同じ Rf 値のゲル断片より N-ST 活性が回収されたことから、以上の操作によって本酵素の精製が完了したものと判断した。

3-2-2 *G. catenatum* の N-ST の諸性質

Superdex 200HR と SDS-PAGE においてそれぞれ標準タンパク質より検量線を作成し N-ST の分子量を求めた (Figs.3-7, 3-9)。Superdex 200HR によるゲル濾過で約 65 kDa、また SDS-PAGE において約 59kDa の位置に一本のバンドが

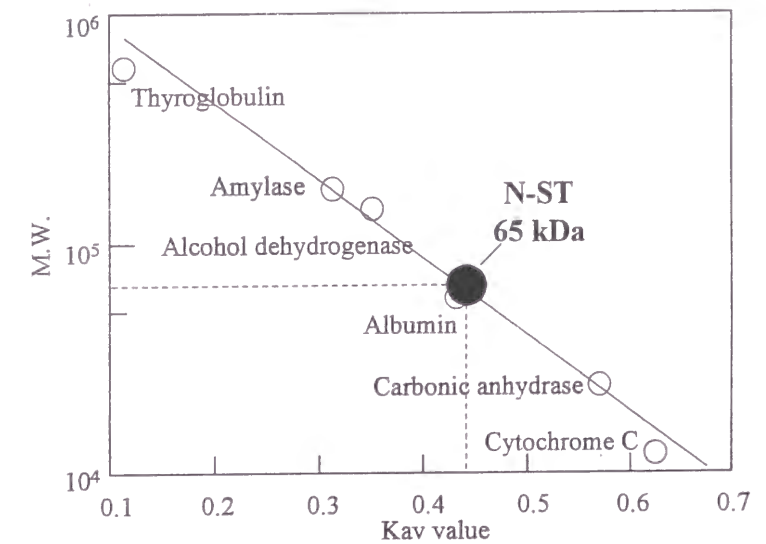


Fig. 3-7. Molecular weight determination of N-ST from *G. catenatum* GC21V by Superdex 200 HR.

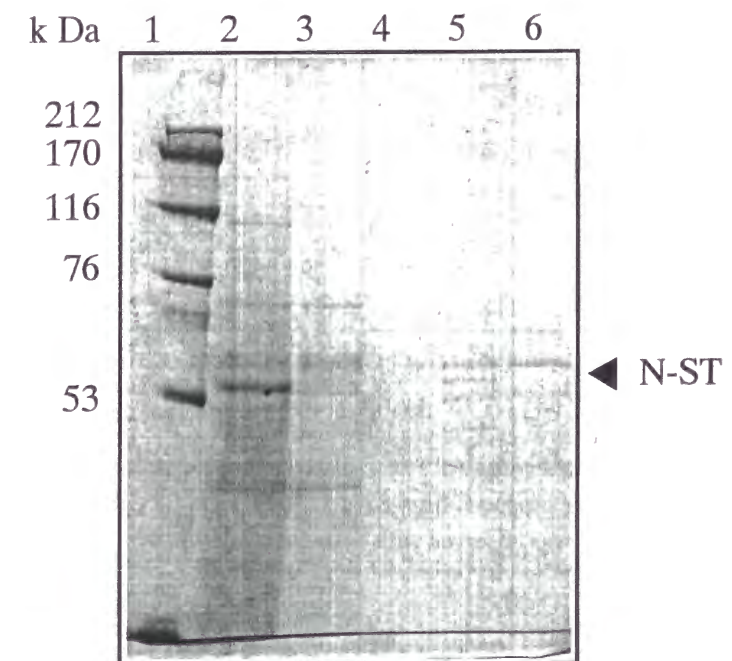


Fig. 3-8. SDS-PAGE of N-ST preparations.

N-ST active fractions in each purification step were subjected to 10 % SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Approximately 1 μg of protein was applied per lane. Lane1, Molecular weight standards; Lane2, (NH₄)₂SO₄ precipitate; Lane3, active fraction from DEAE-cellulose chromatography; Lane4, active fraction from Blue Toyopearl affinity chromatography; Lane 5, active fraction from MonoQ chromatography; Lane6, active fraction from Superdex 200HR gel filtration.

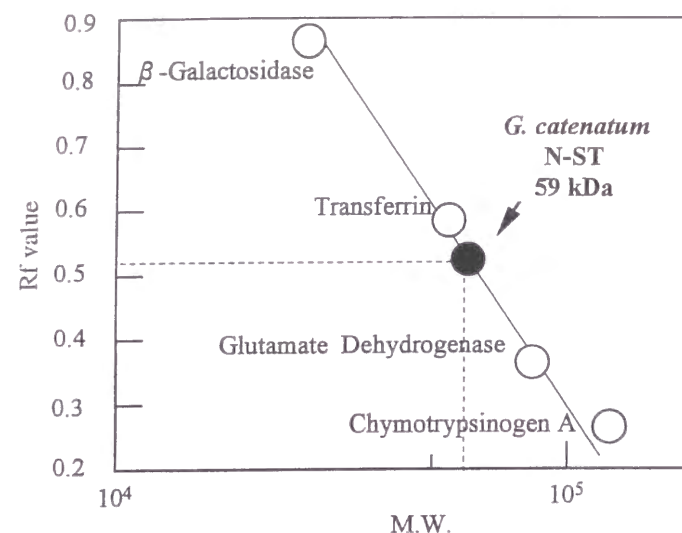


Fig. 3-9 Molecular weight determination of the N-ST from *G. catenatum* GC21V by SDS-PAGE

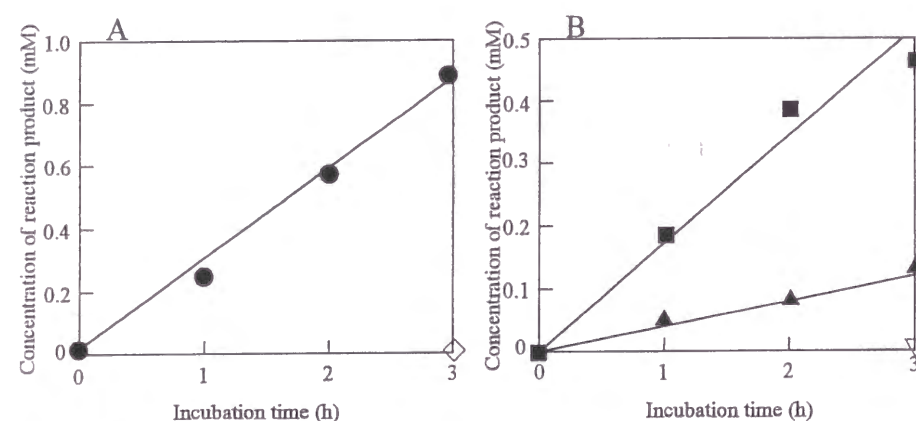


Fig. 3-10. Time-course of reaction products by the N-ST. The N-ST was incubated with PAPS as a sulfate donor and with STX (A) and GTX 2+3 (B). GTX 5 (●) were produced from STX. C1 (■) and C2 (▲) were produced from GTX2+3. No activity was observed with heated enzyme(◇,▽)

得られたことから(Fig.3-8)、本酵素は約 60 kDa のモノマーであると判断した(Fig. 3-9)。

また、精製画分を用いて本酵素の性質の検討を行った。まず、STX、neoST、dcSTX、11- α , β -hyd STX、GTX2+3 および GTX1+4 のそれぞれを基質として、活性を測定したところ、N-ST は、GTX2+3 と STX のみに活性を示した。また、それぞれの反応産物である C1+2 と GTX5 は反応の経時変化に伴い、直線的に増加することが確認され、100°Cで 10 分間の熱処理した酵素液を用いた系では両気質とも反応産物は得られなかった(Fig. 3-10)。さらに、これまでに哺乳類

Table 3-2. Effects of PSP toxins and various compounds on N-ST activity from *G. catenatum* GC21V.

Compounds ^a	Relative activity(%)
None	100
GTX1+4	111
neoSTX	105
dcSTX	101
dcGTX2+3	96
11-hyd STX	121
p-Nitrophenol	130
Naphtylamine	112
L-Tyrosine	93
L-Tyrosine methyl ester	125
L-Tyramine	106
UDP-N-Acetylgalactosamine	105
Dopamine	112
Epinephrine	102
Estron	111

^a These compounds were added to standard reaction mixture to a final concentration of 200 μ M.

本酵素の基質親和性について調べたところ、STX と GTX2+3 に対する K_m 値は、それぞれ 16.1 μ M と 29.8 μ M であった(Fig.3-11 A,C)。また、PAPS に対する K_m 値は、STX を基質としたとき 8.3 μ M で、GTX2+3 を基質にしたとき 78.7 μ M であった(Fig.3-11 B,D)。また、本酵素の至適 pH は 6.0 で(Fig.3-12 A)、

Table3-3. Sulfate donor specificity of the N-ST from *G. catenatum* GC21V.

Sulfate donor	Activity
PAPS (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate)	+
APS (adenosine 3'-phosphate 5'- sulfate)	—
PNS (p-nitrophenyl sulfate)	—
4MUS (4-methylumbelliferyl sulfate)	—

で見ついている硫酸基転移酵素の基質および GTX2+3 および STX 以外の PSP 毒を反応液に添加し、活性に与える影響を調べたところ、いずれの化合物によっても活性の変化は認められなかった(Table 3-2)。

硫酸基供与体として PAPS の代わりに PNS (p-Nitrophenyl sulfate) 、 4MUS (4-Methylumbelliferyl sulfate)あるいは APS (Adenosine 3'-phosphate 5'-sulfate) を加えた場合について N-ST の活性を測定し、本酵素の硫酸基供与体の特異性について調べた。しかしいずれの場合も活性は検出されず、本酵素は硫酸基供与体として PAPS のみを利用した(Table3-3)。

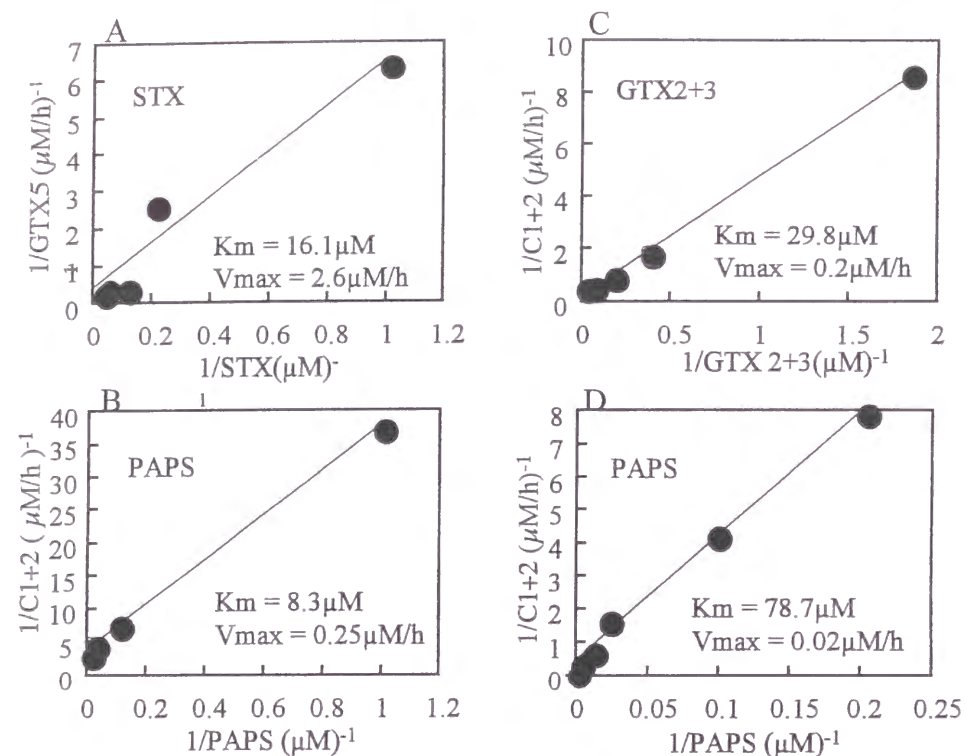


Fig. 3-11. Initial velocity kinetics of the N-ST reaction. Enzyme assay conditions were described in Materials and Methods. A, $1/v$ plotted against $1/[STX2+3]$; B, $1/v$ plotted against $1/[PAPS]$ using STX as a substrate; C, $1/v$ plotted against $1/[GTX2+3]$; D, $1/v$ plotted against $1/[PAPS]$ using GTX2+3 a substrate.

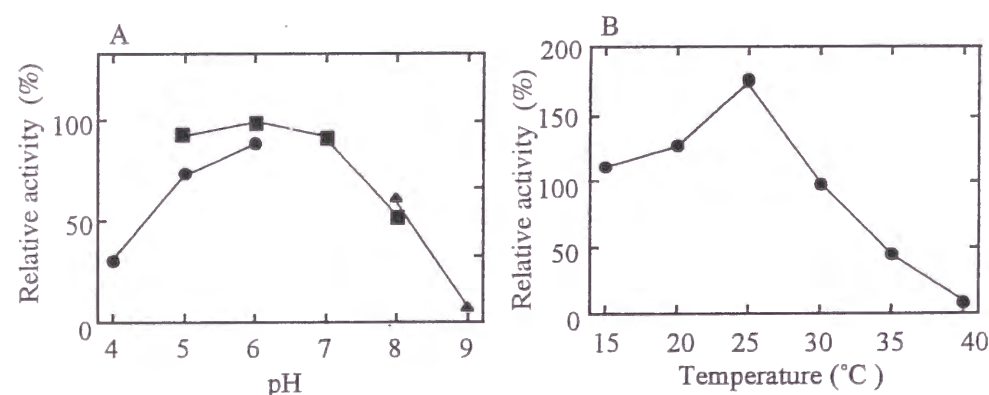


Fig. 3-12. Effects of pH (A) and temperature (B) on *G. catenatum* N-ST activity. Enzyme assay conditions are described in detail in Materials and Methods. The activity was measured with 1.75 μ g of purified N-ST. A, N-ST activity was assayed using the following buffers: 125 mM acetate buffer was used in the range pH 4-6 (●), 125mM phosphate buffer in the range pH 5-8 (■) and 125 mM Tris-HCl in the range pH 8-9 (▲). B, N-ST activity was assayed at the indicated temperature under standard assay conditions.

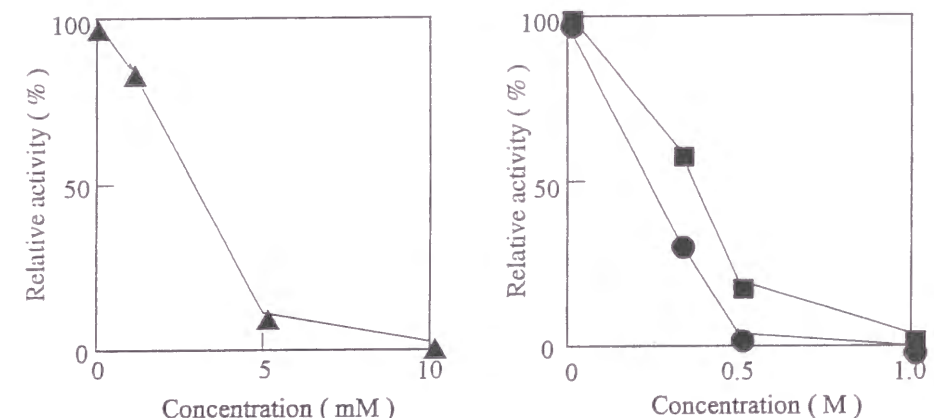


Fig. 3-13. Effect of PAP on N-ST activity. The activity was measured with 1.75 μ g of purified N-ST.

Fig. 3-14. Effect of NaCl (■) and KCl (●) on N-ST activity. The activity was measured with 1.75 μ g of purified N-ST.

Table 3-4. Effect of divalent cations on the N-ST activity.

Cation ^a	Relative activity(%) ^b
None	100
Mg ²⁺	275
Co ²⁺	324
Mn ²⁺	86
Fe ²⁺	23
Ca ²⁺	38
Ni ²⁺	42
Cu ²⁺	16
Zn ²⁺	36

^a Divalent cations (2 mM, final concentration) were added as chloride salts.

^b The enzyme activity was measured with 1.75 μ g of purified N-ST.

3-3 考察

本研究では、PSP 毒の生合成に関する知見を得るため、生理活性物質の代謝における重要性和、有毒渦鞭毛藻類に含まれる PSP 毒の成分の多くが硫酸化されていることを考慮して PSP 毒に対する硫酸基転移酵素に注目した。その結果、スペイン産 *G. catenatum* GC21V 株より、STX と GTX2+3 の N21 位に硫酸基を転移し、それぞれ GTX5 と C1+2 を生じる活性を見いだしたので、精製を行い、性質を検討した。本株を供試藻として選択したのは、*Alexandrium* 属にくらべて毒量が高く、さらに含まれる成分も C1+2 と GTX 5 の N-スルフォカルバモイル毒群が約 80 % を占め硫酸基転移活性が高いことが期待されたからである。

至適温度は 25 °C であった (Fig.3-12 B)。二価金属イオンを反応液に添加し活性に与える影響を調べたところ、Mg²⁺ と Co²⁺ で活性が著しく促進され、何も加えない系にくらべ約 3 倍の増加が認められた (Table 3-4)。また本酵素の活性は、5 mM の PAP、1 M NaCl および 0.5 M の KCl の添加によって完全に阻害された (Figs.3-13,3-14)。

本酵素の活性は、超音波破碎した後、100,000 g の超遠心分離したところ上清画分にのみ回収されたことから、本酵素は報告されているほとんどの ST と同様に、細胞質画分に存在することが示唆された(Matsui and Homma 1994)。細胞質画分以外に存在する ST としては、ラットにおいてペプチド、脂質や多糖質に特異的な ST がゴルジ体膜に(Matsui and Homma 1994)、また、*Euglena* の Tyrosine-ST が葉緑体内に存在することが報告されている(Saidha and Schiff 1994)。

DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーは NaCl のステップワイズによって、また、Blue-Toyopearl 650ML を用いたアフィニティークロマトグラフィーでは KCl のステップワイズによってそれぞれ試料の溶出を行った(Figs.3-2,3-3)。活性の測定に HPLC 法を用いるため、濃度勾配によってタンパク質を溶出した場合、全ての活性画分を測定すると約半日を要するが、ステップワイズでは、得られた一つのピークについて活性を測定するだけでよいので時間の短縮ができ失活を抑えることが期待できる。また、両手法によるタンパク質の除去効率も同等であることを確認している。精製過程において、Blue-Toyopearl 650ML を用いたアフィニティークロマトグラフィーは最も有効な操作で、本カラム操作後 37 倍にまで精製度が高まった(Table 3-1)。本カラムは、アデニンヌクレオチドを基質もしくは補酵素とする酵素に対して親和性を有し、*Euglena* から Tyrosine-ST を精製する際に使用された例が報告されている(Saidha and Schiff 1994)。一般的に、ST の精製には PAP-agarose を用いたアフィニティークロマトグラフィーが有効で最も汎用されているが(Hondoh et al. 1993, Falany et al. 1989)、本酵素は PAP-agarose カラムに吸着しなかった。また、MonoQ カラム操作を行うことによって、酵素活性の収率は著しく減少したが、このカラムに勝る分離条件のよいカラムが他に得られなかったため、本酵素の精製に用いることとした。ST は、不安定な酵素であるとの報告もなされており(Tseng et al. 1985)、今後更なる実験を行う上で、安定化剤等の検討が必要であろう。本実験においてもグリセロールや β -メルカプトエタノールを添加したが、有為な活性の安定化は認められなかった。

多くの ST が、30-36 kDa のオリゴマーである(Matsui and Homma 1994)のに対し、本酵素は、59 kDa のモノマーであった(Fig 3-9)。例外として、ゴルジ膜タンパク質である rat liver heparansulfite-ST および mouse heparan N-deacetylase-ST は、それぞれ、97 kDa と 110 kDa のモノマーである(Hashimoto et al. 1992, Orellana et al.1994)。

本酵素活性は、STX と GTX2+3 の N21 位のみに特異的であり、それぞれに対して構造的には R1 位が OH 基に変化しただけの neo STX と GTX1+4 に対する本

酵素活性は全く検出されなかった。また、R4 側鎖にカルバモイル基をもたず硫酸基を付加するサイトがない dcSTX および dcGTX2+3、R1 側鎖が OH 化されている neoSTX および GTX1+4 のいずれの成分も N-ST の活性を阻害しなかったことから、N-ST は R1 および R4 側鎖の構造を認識していることが予想された。これまでに見出された ST の多くが、水酸基に対して特異的で、アミノ基への硫酸化を触媒する酵素としては、Arylamine-ST (Roy1960, Ramswamy and Jakoby 1987)と N-heparan sulfate-ST (Hashimoto et al. 1992, Orellana et al. 1994)のみに限られる。また、本酵素によって生成される N-スルフォカルバモイル基は天然化合物からの報告はなく(Shimizu 1996)、本酵素は新奇な ST であると思われる。またさらに、反応液に種々の ST の基質や基質以外の PSP 毒成分を加えても、活性の変化が認められなかった (Table 3-2)ことから本酵素活性の基質特異性は極めて高く、PSP 毒成分の STX と GTX2+3 に対して特異的な酵素であることが強く示唆された。

また、STX と GTX2+3 に対する K_m 値を比較した場合、GTX2+3 に対する K_m 値の方が高く(Fig. 3-11)、本酵素は STX に対する親和性がより高いと考えられた。しかしながら *G. catenatum* GC21V 株の PSP 毒組成比は、C1+2 と GTX 5 がそれぞれ 60%と 20%であり(Fig3-1)、GTX2+3 の硫酸化によって生成する C1+2 の組成比が高く、予想に反する結果となった。これについては、STX から GTX2+3 への硫酸化の反応速度が大きく、結果として生成した GTX2+3 を N-ST が基質として利用しているか、あるいは、N-ST によって STX が硫酸化された後の GTX5 から C1+2 への反応速度が大きいことが考えられるが、現在のところ明確な結論を見出すまでにはいたっていない。

本酵素は Mg^{2+} と Co^{2+} によって、著しく活性が促進された(Table 3-4)。このような例は、後述の腸内細菌の ST が知られている (Kim et al. 1992, Lee et al. 1995)。また、Arylamine ST は、本酵素と同様、アミノ基に対して特異的な ST で、 Mg^{2+} によって活性が促進されることが報告されている(Roy 1960)。しかし、ほとんどの ST は、活性に金属イオンを要求せず、 Mg^{2+} と Co^{2+} によって、著しく活性が促進されることは、N-ST の特徴的な性質といえるかもしれない。

最近になり、ヒトやラット腸内細菌より PNS あるいは 4MUS などフェノール硫酸のみを硫酸基供与体として利用する新奇の ST が報告された(Kim et al. 1992, Lee et al. 1995)。しかしながら、今回精製した酵素は、これらを硫酸基の供与体として利用できず、一般的な ST と同様に PAPS のみを利用した(Table3-3)。PAPS に対する特異性は ST に普遍的な性質とされ、最近になり明らかになった、いくつかの ST 遺伝子の塩基配列の比較から、ST が遺伝子ファミリーを形成していると考えられている(Rikke and Roy 1996, Lacomme and Roby

1996)。今後、N-ST の遺伝子の塩基配列が明らかになることで、PSP 毒に特異的な ST が、どのような基質に対する ST から分岐してきたのかが推測されるものと思われ、PSP 毒の生理的な機能を考える上でも非常に興味深い。今回は、精製した N-ST が微量であったため、アミノ酸配列を決定することはできなかったが、今後、N-ST のアミノ酸配列を決定し、さらにそれをコードする遺伝子の塩基配列が明らかになることが期待される。

3-4 摘要

スペイン産 *G. catenatum* GC21V 株を用いて ST の精製を行った。本株は、*Alexandrium* 属 2 種に比べ 1 細胞当たりの毒量が高く、主成分として分子内に硫酸基が 2 個付加した C1+2 を多く含むことから硫酸基転移酵素の検索には最適な株であると判断した。検索の結果、3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) を硫酸基の供与体とし、STX と GTX 2+3 の N21 位に硫酸基を付加してそれぞれ GTX 5 と C1+2 へと変換する酵素 (N-ST) を見いだした (Fig.1-2)。そこで、約 200 l の培養から藻体を集め、硫安分画、DEAE-cellulose、Blue Toyopearl、Mono Q、Superdex 200HR の各種カラム操作を行い、N-ST を電気泳動的に単一バンドにまで精製を行った。精製した本酵素の諸性質を検討したところ、約 60 kDa のモノマーで、基質特異性は極めて高く STX と GTX 2+3 のみに活性を有した。硫酸基供与体として PAPS に対してのみ特異性を有し、 Mg^{2+} と Co^{2+} によって活性が促進された。また、反応の至適温度は 25°C、至適 pH は 6 であり、STX と GTX 2+3 に対する K_m 値は、それぞれ 16.1 μM 、29.8 μM であった。

第 4 章 *Alexandrium catenella* からの 麻痺性貝毒硫酸基転移酵素 N-ST の精製とその性質 ならびに PSP 原因渦鞭毛藻類における N-ST の分布

筆者は、日本における主たる PSP 原因藻が *Alexandrium* 属藻類であることに留意して、当初からこれらの培養株を用いて PSP 毒に対して特異的な ST の検索を行ってきた。しかしながら、非常に微弱な活性しか検出されず、その精製は困難であった。前章では、*Alexandrium* 属藻類に比べ、一細胞当たりの毒量が高く、C11 位あるいは N21 位に硫酸基を有する GTX5+6 や C1-4 が多いことが明らかにされているスペイン産 *G. catenatum* GC21V 株を用いて ST の検索を行った。その結果、STX と GTX2+3 の N21 位に硫酸基を転移し、それぞれ GTX5 と C1+2 を生じる N-ST を見だし、精製を行った。そこで、前章で明らかとなった N-ST の性質に基づき、大量培養により集めた *Alexandrium* 属からの N-ST の精製を再度試みた。また、N-ST を検索していく上で、GTX5 あるいは C1+2 の成分組成比が高い株は N-ST の活性が高いことが期待されるので、C1+2 成分の比率が 95% 以上を占める *A. catenella* Acko5 株 (Fig. 4-1) を用い本酵素の検索を行った。しかしながら、得られた酵素活性は非常に微弱だったため、酵素活性測定条件を再検討し、酵素反応液中に含まれる PAPS 量を *G. catenatum* の N-ST の活性測定条件の 10 倍量加え、また反応液の緩衝液を酢酸緩衝液に変更することで、*A. catenella* Acko5 株の細胞破碎液から回収され

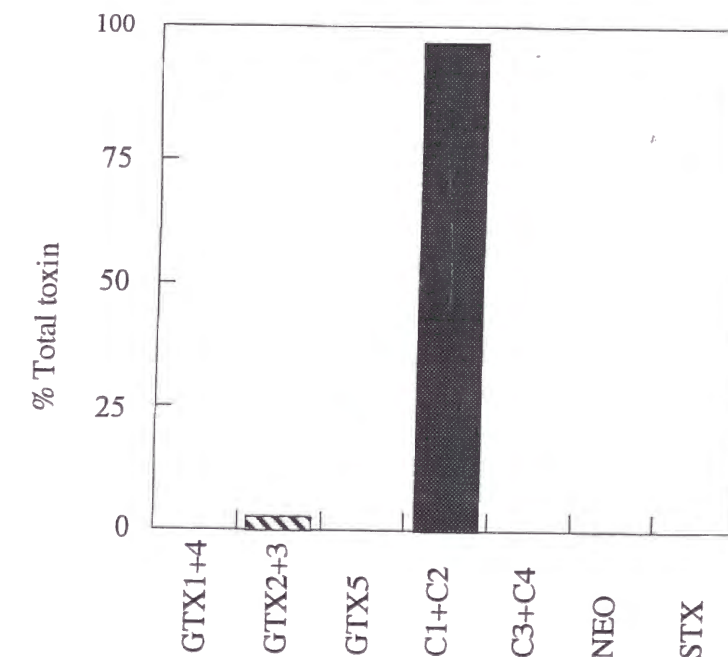


Fig. 4-1. Toxin Composition of *Alexandrium catenella* Acko5

る N-ST 活性の向上が認められた。本章では、*A. catenella* Acko5 株より N-ST (AcN-ST) の精製を試み、性質を明らかにし、*G. catenatum* の N-ST (GcN-ST) との比較検討を行った。さらに、代表的な PSP 毒原因渦鞭毛藻類のうち *G. catenatum* GC21V 株と *A. catenella* Acko5 株を除く *G. catenatum*、*A. tamarense*、*A. catenella*、*A. lusitanicum* および *A. ostenfeldii* の計 5 種 7 株について N-ST の分布を調べ、N-ST がこれら有毒渦鞭毛藻類に普遍的な酵素であるのか否かについて検討を行った。

4-1 材料及び方法

4-1-1 *A. catenella* Acko5 株 の培養及び集藻方法

本実験に用いた株は高知県浦ノ内湾産 *A. catenella* Acko5 株、岩手県大船渡湾産 *A. catenella* OF 072 株、広島県広島湾産 *A. tamarense* HI 38 株、愛知県渥美湾産 *A. tamarense* At 503 A 株、愛知県渥美湾産 *A. tamarense* At 304 A 株、スペイン産 *A. lusitanicum* AL 1 V 株、デンマーク産 *A. ostenfeldii* 0287 株および京都府宮津湾産 *G. catenatum* MZ13 株の計 5 種 8 株である。これらの渦鞭毛藻類を 3-1-1 に示した標準培養条件下で培養した。ただし、*A. catenella* Acko 5 株の 2 株のみ 20 °C、他の種及び株は 15 °C で培養を行った。大量培養をする際には駒型フラスコに 2 L の SWIIm 培地を入れたものを用いた。対数増殖期中期の培養藻体を孔径 20 μ m のナイロンネットあるいは孔径 15 μ m のプランクトンネットを用いて集め、遠心管に移して 1200 g \times 5 min の遠心分離 (Beckman 社 CP Centrifuge) を行い集藻した。集藻後、洗浄用緩衝液 (10mM Tris-HCl、10mM EDTA、50mM NaCl、pH 7.0) に藻体を懸濁し再度遠心分離して藻体を集め、液体窒素中で急速凍結し、-90°C のディープフリーザーで保存した。

4-1-2 N-ST の活性測定法および HPLC 蛍光分析

エッペンドルフチューブに GTX2+3 を 3 μ l (0.03 mM)、10mM PAPS を 3 μ l (0.6 mM)、200mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) を 19 μ l (76 mM)、酵素液を 25 μ l 加え、全量を 50 μ l とし、15°C で 1h 反応させた。0.5 N の酢酸水溶液を添加して反応を止めた後、ウルトラフリー C3LGC を用いて分子量 10,000 の限外濾過を行った。得られた濾液は HPLC に供し、反応産物である C1+2 を定量した。HPLC 蛍光分析は 2-1-3 に従った。なお、AcN-ST 活性はタンパク質 1mg 当たり 1 時間に生成された C1+2 量 (μ M / mg \cdot h) である比活性で表した。

4-1-3 酵素液の調製

3-1-4-1 に従って細胞を破碎し、遠心分離により上清を得た後、20 ~ 80 % の硫酸分画を行い、25,000 g \times 30 min の遠心分離によって得られた沈殿を緩衝液 A に懸濁し、同緩衝液に対して一晚透析を行った後、以下のカラム操作に順次供した。以後すべての操作は 5°C で行った。

4-1-4 DEAE-cellulose 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

緩衝液 A に懸濁した DEAE-cellulose (Whatman 社) を C10/20 カラム (Pharmacia 社) に充填 (ϕ 10 \times 200mm) し、2 倍量の緩衝液 A で平衡化した。このカラムに 4-1-3 で調製した酵素液を流速 0.8 ml/min で添加した後、緩衝液 A で洗浄した。その後、0.1、0.2、0.3 及び 2.0 M NaCl を含む緩衝液 A のステップワイズにより試料を溶出した。活性画分を集めて緩衝液 B で透析を行った。

4-1-5 Blue Toyopearl アフィニティーカラムクロマトグラフィー

緩衝液 B に懸濁した AF-Blue Toyopearl 650ML (東ソー社) を XK16/40 カラム (Pharmacia 社) に充填 (ϕ 16 \times 20 mm) し、2 倍量の緩衝液 B で平衡化した。このカラムに 4-1-4 で調製した酵素液を流速 0.4 ml/min で添加した後、緩衝液 B で洗浄した。その後、流速 0.8 ml/min で 0.1、0.2、0.3 及び 2.0 M KCl を含む緩衝液 B のステップワイズにより試料を溶出した。

4-1-6 Hi-Trap Chelating アフィニティーカラムクロマトグラフィー

Hi-Trap Chelating (Pharmacia 社) に 予めりガンドとして 0.1M CuCl₂ を吸着させた後、5 倍量の緩衝液 B で平衡化した。このカラムに 4-1-5 で得られた活性画分を流速 0.4ml/min で添加し、緩衝液 B で洗浄した。その後緩衝液 C (50 mM リン酸緩衝液 pH 5.0) および 0.05M EDTA を含む緩衝液 C のステップワイズにより試料を溶出した。活性画分を集めて緩衝液 D (20 mM 酢酸緩衝液 pH 6.0) で透析を行った。

4-1-7 Red Toyopearl アフィニティーカラムクロマトグラフィー

緩衝液 D に懸濁した AF - Red Toyopearl 650ML (東ソー社) を XK16/40 カラム (Pharmacia 社) に充填 (ϕ 16 \times 10 mm) し、2 倍量の buffer D で平衡化した。このカラムに 4-1-6 で調製した酵素液を流速 0.4ml/min で添加し、20mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) で洗浄した。その後、流速 0.8 ml/min で 0~1.0 M KCl を含む 20mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) のグラジェントにより試料を溶出した。活性画分を集めて 20mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で透析を行った。

4-1-8 Mono Q 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

FPLC System に Mono Q HR 5/5 (Pharmacia 社) を装着し、2 倍量の 20 mM Phosphate buffer (pH 7.0) で平衡化した。4-1-7 で調製した酵素液を Molcut (Millipore 社) で濃縮した後、このカラムに流速 0.8 ml/min で添加し、20mM リン酸緩衝液(pH 7.0) で洗浄した。その後、0~1.0 M NaCl を含む同一の緩衝液の濃度勾配により試料を溶出した。

4-1-9 Superdex 200HR カラムクロマトグラフィー

FPLC System に Superdex 200HR (Pharmacia 社) を装着し、2 倍量の 200mM 酢酸緩衝液(pH 6.0) で平衡化した。4-1-8 で調製した酵素液を Molcut II LGC (Millipore 社) およびウルトラフリーC3LGC で濃縮した後、このカラムに流速 0.5ml/min で添加し、200 mM 酢酸緩衝液(pH 6.0) で試料を溶出した。また、分子量測定用標準タンパク質 (Pharmacia 社) を用いて検量線を作成し、分子量を測定した。

4-1-10 *A. catenella* Acko5 株からの N-ST の諸性質の検討

第3章 3-1-3 に従って行った。

4-1-11 PSP 原因渦鞭毛藻類における N-ST の分布

4-1-11-1 粗酵素液の調製

4-1-1 で集藻、保存しておいた藻体に同湿重量の 200 mM glycylglycine-NaOH pH 8.0 を加え、氷冷下で超音波破碎を行った後、100,000 g、30 分間の超遠心分離に供し上清を得た。その上清を、0.1 M NaCl を含む 50 mM glycylglycine-NaOH pH 8.0 で平衡化した HiTrap Desalting カラム(Pharmacia 社) に供し、得られた画分を粗酵素液とした。

4-1-11-2 N-ST 活性の測定法

反応液を 4-1-2 に従い作成した。その反応液に 4-1-11-1 で調製した粗酵素液を 50 μ l 加え、20 $^{\circ}$ C、4 時間反応を行った。以下の操作は 3-1-2 に従った。また、終濃度が 5 mM となるように $MgCl_2$ 又は $CoCl_2$ を反応液に加えた系についても検討した。

4-2 結果

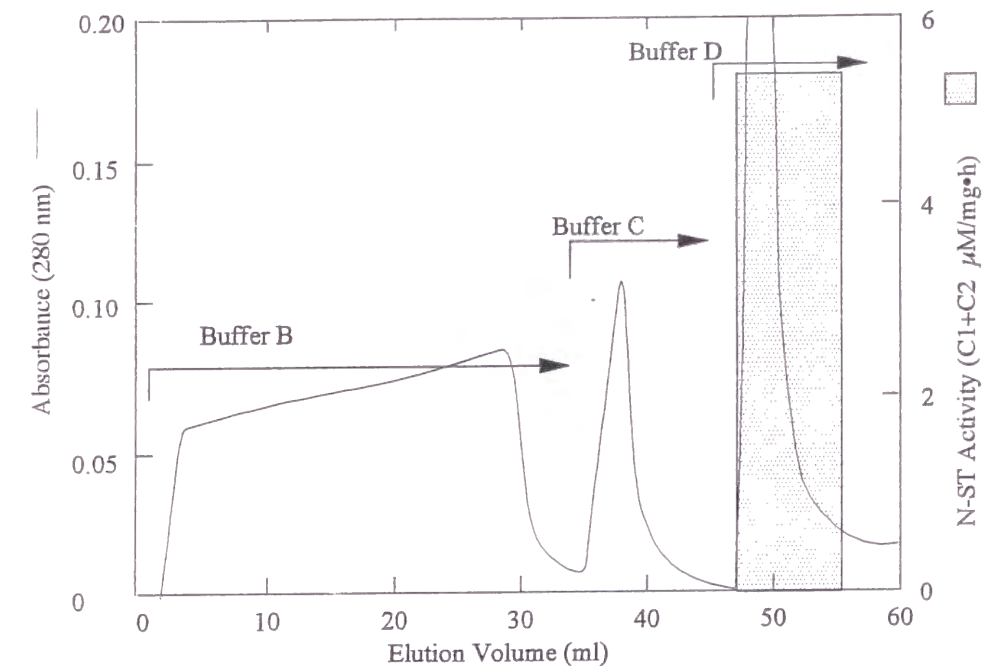


Fig.4-2. Hi-Trap Chelating column chromatography of N-ST from *A. catenella* Acko5. N-ST active fraction on Blue Toyopearl column was applied to a Hi-Trap Chelating column. Protein was eluted with buffer B:50 mM phosphate buffer (pH 7), buffer C: 50 mM phosphate buffer (pH 5) and buffer D:50 mM phosphate buffer (pH 5) containing 0.05M EDTA.

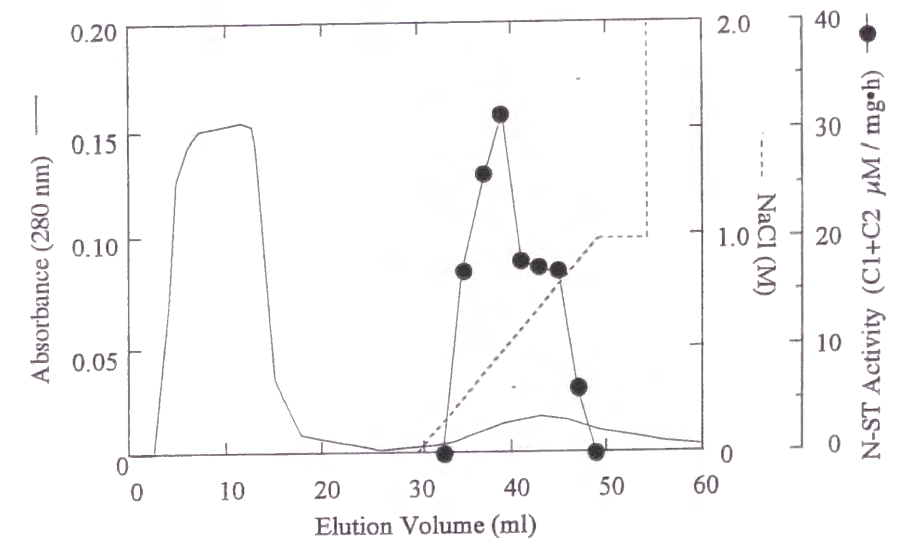


Fig. 4-3. AF-RED Toyopearl 650ML column chromatography of N-ST from *A. catenella* Acko5. The active fraction on Hi-Trap chelating column was applied to a AF-RED Toyopearl 650ML column equilibrated with acetate buffer (pH 6.0). The column was eluted by linear gradient of NaCl concentration from 0 to 1.0 M in acetate

Table 4-1. Summary of Purification of N-ST from *A. catenella* Acko5.

Preparation	Total Protein (mg)	Total activity (μM C1+2/h)	Yield (%)	Specific Activity (μM C1+2/h•mg)	Purification Factor (fold)
Crude extract	620.3	—	—	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	237.1	—	—	—	—
DEAE-cellulose	84.5	36.0	100	0.4	1
Blue Toyopearl	46.9	126.9	353	2.7	6.8
Hi-Trap Chelating	3.9	21.8	61	5.5	13.8
Red Toyopearl	0.6	8.9	25	14.8	37
Mono Q	0.14	7.5	21	55.6	139
Superdex 200HR	0.01	0.32	0.89	22.8	57

—; not determined

4-2-1 *A. catenella* Acko5 株からの N-ST の精製

本酵素の精製は、硫酸分画と DEAE-cellulose、Blue Toyopearl、Hi-Trap Chelating、Red Toyopearl、Mono Q および Superdex 200HR の各カラム操作によって行った。まず、陰イオン交換カラム DEAE-cellulose では 0.2 M NaCl で溶出した画分に活性があり、この画分を アフィニティーカラム Blue Toyopearl に供した。AcN-ST は本カラムには吸着せず非吸着画分に活性が回収された。次に用いた アフィニティーカラム Hi-Trap Chelating カラムでは、本酵素は 0.05 M EDTA を含むリン酸緩衝液で リガンドにキレートされた Cu²⁺ とともに溶出させた(Fig.4-2)。次に アフィニティーカラム Red Toyopearl に供したところ、本酵素は非吸着部分に回収される大部分のタンパク質とは異なり 0.1-0.8 M NaCl の広い範囲の塩濃度で溶出する吸着画分に、活性が回収された(Fig.4-3)。次に、陰イオン交換カラム Mono Q ではタンパク質はよく展開し、本酵素は 0.3~0.4 M NaCl で溶出された。さらに画分をゲル濾過カラム Superdex 200HR に供し、最終的に本酵素は 57 倍まで精製された(Table 4-1)。この時の活性画分を Native-PAGE に供したところ、Rf 値 0.31 の位置にバンドが得られたが、ゲルから活性を回収することは出来なかった。そこで硫酸分画後、アフィニティーカラム Hi-Trap Chelating に供した酵素液を同時に泳動しておき、5 mm 幅でゲルを切り出し、AcN-ST 活性を測定した。その結果、Rf 値 0.27 ~ 0.36 に N-ST 活性のピークがあることから、Rf 値 0.31 のバンドは本酵素であり、精製が完了したと判断した。

4-2-2 *A. catenella* Acko5 株からの N-ST の諸性質

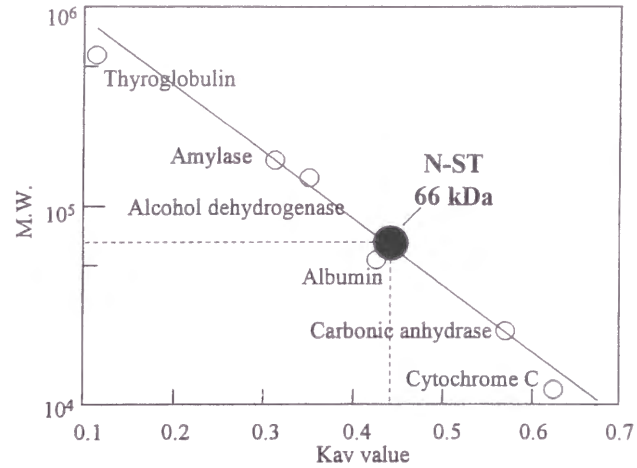


Fig. 4-4. Molecular weight determination of N-ST from *A. catenella* Acko5 by Superdex 200 HR.

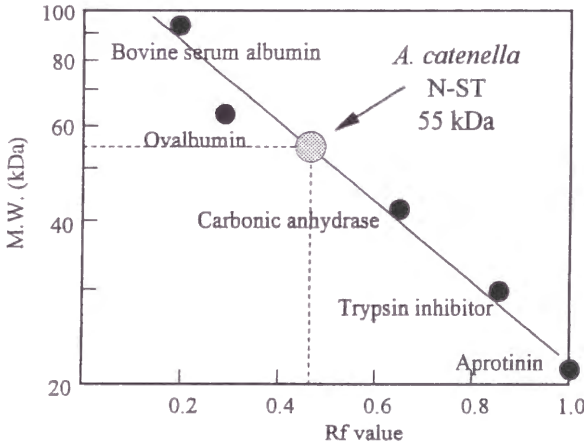


Fig. 4-5. Molecular weight determination of *A. catenella* N-ST by SDS-PAGE.

活性画分をゲル濾過カラム Superdex 200HR に供した結果、本酵素は 分子量 66kDa 付近に回収された (Fig. 4-4)。また、ゲル濾過カラム後の同じ活性画分を SDS-PAGE に供したところ、分子量 55kDa を示すバンドが 1 本得られ、本酵素は約 60 kDa 前後のモノマーであると推定された (Fig.4-5)。

精製した AcN-ST が十分量得られなかったため、前章のカラム操作手順に従いアフィニティーカラム Blue Toyopearl に供して部分精製した酵素液を用いて性質を検討した。まずこれまでに哺乳類で見ついている硫酸基転移酵素の基質を過剰量加えることにより、本酵素の活性に与える影響を調べたところ、いずれの化合物によっても活性はほとんど阻害されなかった (Table 4-2)。

次に、硫酸基供与体として PAPS の代わりに 4MUS または PNS を加えた場合、さらに APS を加えた場合についても AcN-ST の活性を測定し、本酵素の硫酸基供与体の特異性について調べた。しかしいずれの場合も活性は検出されず、本

Table 4-2. Effects of PSP toxins and various compounds on N-ST activity from *A. catenella* Acko5.

Compounds ^a	Relative activity(%)
None	100
GTX1+4	113
neoSTX	111
dcSTX	93
dcGTX2+3	89
p-Nitrophenol	113
Naphtylamine	95
L-Tyrosine	96
L-Tyrosine methyl ester	95
L-Tyramine	116
UDP-N-Acetylgalactosamine	113
Dopamine	96
Epinephrine	116
Estron	104

^a These compounds were added to standard reaction mixture to a final concentration of 200 μM.

酵素は硫酸基供与体として PAPS に特異性があることが明らかになった(Table 4-3)。

本酵素の GTX2+3、STX、PAPS に対する 基質親和性について調べた (Fig. 4-6)。その結果、STX と GTX2+3 に対する Km はそれぞれ 4.0 μM と 14.9 μM であり、PAPS にたいする Km 値は STX を基質とした場合 2.8 mM、また、GTX2+3 を基質とした場合 226 μM であった。

また、至適 pH について 3 種類 の緩衝液 を用いて調べた結果、pH 5.0 の酢酸緩衝液が至適条件であった (Fig. 4-7A)。15 ~40 °C の範囲で本酵素の至適温度を調べたところ 25 °C であった (Fig.4-7B)。

次に、二価金属イオンを反応液に添加し活性に与える影響を

調べた (Table 4-4)。その結果、Ni²⁺ を添加した場合 20 % 程度の活性の促進が認められたものの、その他の金属イオンでは活性への影響は認められなかった。

Table4-3. Sulfate donor specificity of the N-ST from *A. catenella* Acko5.

Sulfate donor	Activity
PAPS (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate)	+
APS (adenosine 3'-phosphate 5'- sulfate)	—
PNS (p-nitrophenyl sulfate)	—
4MUS (4-methylumbelliferyl sulfate)	—

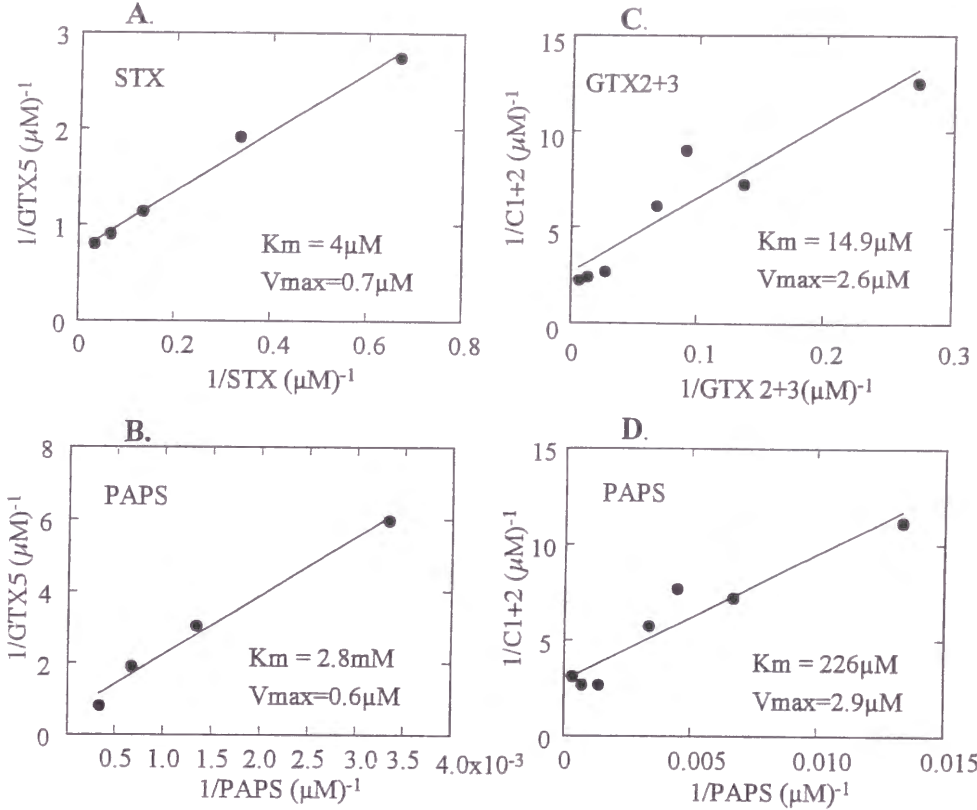


Fig. 4-6. Initial velocity kinetics of the reaction of N-ST from *A. catenella* Acko5. Enzyme assay conditions were described in Materials and Methods. A, 1/v plotted against 1/[STX]; B, 1/v plotted against 1/[PAPS] using STX as a substrate; C, 1/v plotted against 1/[GTX2+3]; D, 1/v plotted against 1/[PAPS] using GTX2+3 a substrate.

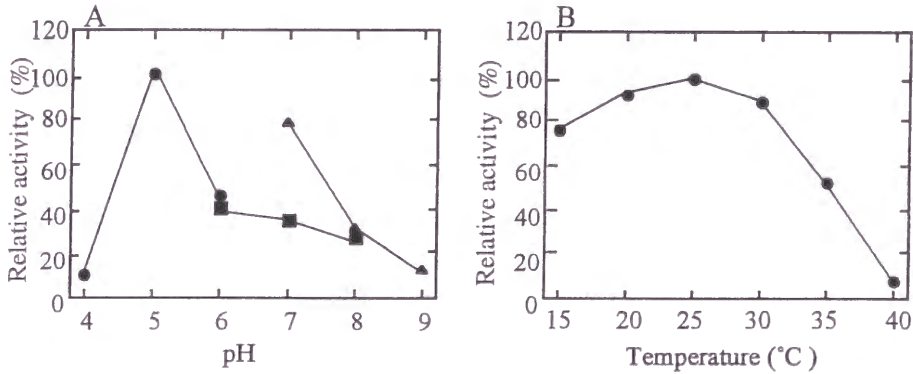


Fig. 4-7. Effects of pH (A) and temperature (B) on *A. catenella* N-ST activity. Enzyme assay conditions are described in detail in Materials and Methods. The activity was measured with partial purified N-ST. A, N-ST activity was assayed using the following buffers: 125 mM acetate buffer was used in the range pH 4-6 (●), 125mM phosphate buffer in the range pH 6-8 (■) and 125 mM Tris-HCl in the range pH 7-9 (▲). B, N-ST activity was assayed at the indicated temperature under standard assay conditions.

Table 4-4. Effect of divalent cations on the N-ST activity.

Cation ^a	Relative activity(%) ^b
None	100
Mg ²⁺	85
Co ²⁺	103
Mn ²⁺	97
Fe ²⁺	23
Ni ²⁺	121
Cu ²⁺	108
Zn ²⁺	88

^a Divalent cations (5mM, final concentration) were added as chloride salts.

^b The enzyme activity was measured with partial purified N-ST from *A. catenella* Acko5.

4-2-3 PSP 原因渦鞭毛藻類における N-ST の分布

本実験には供試藻として岩手県大船渡湾産 *A. catenella* OF 072 株、広島県広島湾産 *A. tamarense* HI 38 株、愛知県渥美湾産 *A. tamarense* At 503 A 株、愛知県渥美湾産 *A. tamarense* At 304 A 株、スペイン産 *A. lusitanicum* AL 1 V 株、デンマーク産 *A. ostenfeldii* 0287 株および京都府宮津湾産 *G. catenatum* MZ13 株を用いた。藻体をを破碎した後、HiTrap Desalting カラム (Pharmacia 社) に供して

画分を粗酵素液とし、実験に用いた。この操作により細胞由来の PSP 毒成分は

Table 4-5. Distribution of N-ST among toxic dinoflagellates.

Strains	Origin	N-ST activity
<i>G. catenatum</i> GC21V	Vigo, Spain	+
MZ13	Miyazu, Japan	+
<i>A. tamarense</i> HI38	Hiroshima, Japan	+
At503A	Aichi, Japan	+
At304A	Aichi, Japan	+
<i>A. catenella</i> Acko5	Kochi, Japan	+
OF072	Iwate, Japan	+
<i>A. lusitanicum</i> AL1V	Vigo, Spain	+
<i>A. ostenfeldii</i> 0287	Limfjorden, Denmark	+

ほぼ除去することができた。検索を行ったところ、N-ST は全ての株において活性が認められた(Table4-5)。*G. catenatum* MZ13 株では、MgCl₂ と CoCl₂ を反応液に添加した場合に高い活性が得られ、他の株では添加しない場合にのみ活性が認められた。しかし、*G. catenatum* MZ13 株以外の活性は低く、データは示さないが *G. catenatum* MZ13 株の N-ST の比活性を 100 として 10 以下でしかなかった。

4-3 考察

これまでに *A. catenella* Acko5 株とは分離地の異なる株や *A. tamarense* 株でも N-ST の検索が行われたのにも関わらず、非常に活性が低いかあるいは全く見いだせない株も見られた(藤井 1996)。本酵素 AcN-ST においても、GcN-ST と同じ反応液条件では、DEAE-cellulose カラム後の比活性が GcN-ST の 6 分の 1 程度であった。予備実験の結果から、*Alexandrium* 属の種からの N-ST の検出が困難であるのは、N-ST の PAPS に対する親和性が低いことによるのではないかと考えられた。実際、Ac-ST が、ST の精製に汎用されている PAP-agarose に吸着しなかったことからこのことが支持される。またこれまでに ATP や PAP は PAPS 類似体として硫酸基転移酵素の活性を阻害するという報告がなされている(Lo-Guidice et al. 1995, Saidha and Schiff 1994)。*Alexandrium* 属の N-ST についても粗酵素液中では、N-ST 活性を阻害するような物質や PAPS に対して競合するタンパク質によって活性が抑制されていることも考えられた。本実験では GcN-ST 活性測定用反応液の PAPS 濃度を 10 倍高く添加し、その結果より安定した AcN-ST 活性を回収することができた。

精製過程において、本酵素は Blue Toyopearl カラムには吸着せずに溶出された。このカラム は NAD⁺ や NADP⁺ などのアデニンヌクレオチド要求性のタンパク質を精製するためのアフィニティーカラムであるが、ここでは特異性の強いタンパク質を吸着させ、目的のタンパク質を溶出するというネガティブアフィニティーカラムとして利用した。この操作によって非活性が 7 倍に上昇しているが(Table 4-1)、これは PAPS に親和性の高いタンパク質が除去されたためではないかと考えられる。次に用いた アフィニティーカラム Hi-Trap Chelating カラムは、タンパク質の外側に位置するアミノ酸残基と金属イオンが錯体を形成する性質を利用したものである。リガンドとしてよく用いられる金属イオンは Zn²⁺ や Cu²⁺ であり、Zn²⁺ は 1 個のヒスチジン残基と、Cu²⁺ は 2 個のヒスチジン残基と錯体を形成する。Zn²⁺ と Cu²⁺ の両方についてそれぞれ予備的に検討した結果、Zn²⁺では本酵素は全く吸着せず、Cu²⁺では強力に吸着するため本酵素は EDTA で Cu²⁺ とともに溶出させた(Fig.4-2)。またこの画分

については透析を行っても活性に変化はなく、回収率も非常に良いことから、Blue Toyopearl での非吸着画分の有効な濃縮が可能であった。また、Red Toyopearl カラムについて、本酵素は Blue Toyopearl との組み合わせによってのみこのカラムに吸着した。このカラムは Blue Toyopearl 同様アデニンヌクレオチドに親和性を持つタンパク質を吸着するが、Blue Toyopearl とは溶出パターンが異なり、本実験ではこの溶出パターンの違いを利用したカラム操作となっている。

部分精製した本酵素の諸性質の検討を行い、GcN-ST の性質との比較を行った(Table 4-6)。本酵素は、GcN-ST と同様に、STX と GTX2+3 の、N21 位のみの特異的であり、硫酸基供与体として PAPS のみを利用した。

Table 4-6. Comparison of *G. catenatum* N-ST and *A. catenella* N-ST.

	<i>G. catenatum</i> GC21V	<i>A. catenella</i> Acko5
Substrate	GTX 2+3 STX	GTX 2+3 STX
Sulfate donor	PAPS	PAPS
Optimum temperature	25°C	25°C
Optimum pH	6.0 (phosphate buffer)	5.0 (acetate buffer)
Cation requirement	Mg ²⁺ , Co ²⁺	None
Km		
PAPS (GTX2+3 as substrate)	78.7 μM	226 μM
GTX2+3	29.8 μM	2.9 μM
PAPS (STX as substrate)	8.3 μM	2.8 mM
STX	16.1 μM	4.0 μM
M.W. determined by SDS-PAGE	60 kDa	55 kDa

一方、GcN-ST と AcN-ST の PAPS に対する親和性を比較すると、AcN-ST では、非常に低いことが明らかとなった。GcN-ST はアフィニティーカラム Blue Toyopearl に吸着するのに対し、同じ条件でカラム操作を行っても本酵素は吸着せずに溶出するが、これは基質親和性に差異があることによると考えられた。また今回の実験で、STX を基質にした時の 本酵素の PAPS の Km 値が GTX2+3 を基質にした時に比べて非常に高いのは、STX あるいは GTX 5 を持たない *A. catenella* Acko5 の毒組成と関係があるかもしれない。また、GcN-ST は STX と GTX2+3 の両方に対して同じくらいの親和性を持つが、GTX5 が 20% に達する *G. catenatum* GC21V 株 の毒組成と関係があるかもしれない。しかし現段階では PSP 毒修飾・変換酵素の遺伝子レベルでの解析もなされておらず、結論を述べるにはあまりにも情報が少なすぎるといえるだろう。

また至適 pH について 3 種類 の緩衝液 を用いて調べた結果、pH 5.0 (酢酸緩衝液)が至適条件であった (Fig. 4-7)。GcN-ST は pH 6.0 (リン酸緩衝液)を至適条件としている。しかし本酵素は、pH 6.0 (リン酸緩衝液あるいは酢酸緩衝液いずれにおいても)の反応条件では pH 5.0 (酢酸緩衝液) に比べて比活性が 40 % しかなかった。

AcN-ST は金属イオンによる活性への影響はほとんど認められないのに対し、GcN-ST は Mg²⁺ や Co²⁺ で活性が著しく促進される。京都府宮津産 *G. catenatum* MZ 株からの N-ST においても、Mg²⁺ や Co²⁺ で活性が著しく促進されるという結果が得られていることから、GcN-ST 活性は一般に上記二価金属イオンによって促進されると考えられる (藤井 1996)。金属イオン要求性については、前章でも述べたとおり、腸内細菌の phenol-ST と ラットの Arylamine ST で報告されているのみであり(Kim et al. 1992, Lee et al. 1995, Roy 1960)、Mg²⁺ や Co²⁺ で活性が著しく促進されることは、GcN-ST の特徴的な性質といえる。

また、代表的な PSP 毒原因渦鞭毛藻類のうち *G. catenatum*GC21V 株と *A. catenella* Acko5 株を除く *G. catenatum*、*A. tamarense*、*A. catenella*、*A. lusitanicum* および *A. ostenfeldii* の計 5 種 7 株について N-ST の分布を調べた。AcN-ST では、GcN-ST の至適反応条件の 10 倍量の PAPS を要することが明らかとなったため、この実験では、AcN-ST の至適反応条件に準じた反応液を用いた。その結果、いずれの株においても N-ST 活性が認められ、本酵素が PSP 原因渦鞭毛藻類に広く分布する酵素であることが示唆された。GcN-ST に比べ、*Alexandrium* 属の各株のいずれにおいても酵素の比活性が低かったことについては、各株における N-ST の反応至適条件が異なっているためであると思われる。PAPS に対する親和性のみならず、反応の至適 pH についても、GcN-ST では最適なリン酸緩衝液では、AcN-ST の活性は非常に低い(Fig.4-8)。そのため、

今後は各株の N-ST それぞれについての反応条件の検討を行う必要がある。

今回の結果より N-ST が、PSP の原因藻類である *G. catenatum* や *Alexandrium* 属の種に普遍的に存在することが示唆された。一方、PSP 毒を生産しない *G. catenatum* (オーストラリア産及び香川県播磨灘産) 株において N-ST 活性が検出されており、N-ST は、PSP 毒の生合成にはリンクしていない酵素であるという報告がなされている(大島 1997)。しかし、これは PSP 毒の骨格形成に関与する酵素遺伝子のいずれか欠失しているために PSP 毒が検出されないものと考えられる。従って、上記のような無毒株に PSP 毒の骨格形成後に働く硫酸基転移酵素活性が存在しても何ら矛盾はないと思われる。今後、*A. affine* などの無毒種、あるいは *Aphanizomenon flos-aqua* や *Anabaena circinalis* あるいは *Lyngbya* などの PSP 毒生産能を有するラン藻についても N-ST の分布を明らかにする必要がある。

4-4 摘要

高知県浦ノ内湾産 *A. catenella* Acko5 株の毒成分を調べたところ、約 95 % が C1+2 であることから、N-ST の活性が高いものと考え、本株より N-ST (AcN-ST) の精製を試みた。硫安分画、DEAE-cellulose、Blue Toyopearl、High-Trap Chelating、Red Toyopearl、Superdex200HR の各種カラム操作によって、本酵素は 57 倍にまで精製された。精製した AcN-ST の性質を検討したところ、60 kDa 前後のモノマーであり、基質特異性は極めて高く STX と GTX 2+3 のみに活性を有し、PAPS のみを硫酸基供与体として利用した。反応の至適温度は 25 °C、至適 pH は 5.0 であり、反応に金属イオンを要求しなかった。STX と GTX2+3 に対する K_m 値は、それぞれ 4.0 μ M と 2.9 μ M であった。また、*G. catenatum* GC21V 株より精製した N-ST (GcN-ST) と AcN-ST の PAPS に対する親和性を比較すると、AcN-ST では、非常に低いことが明らかとなった。このように二つの N-ST の性質と比較するといくつかの点で差異が認められるものの、ともに PAPS を硫酸基の供与体とし、STX と GTX 2+3 の N 21 位のみに硫酸基を付加する酵素であった。

また、*A. tamarense* HI28 株、At304 株、At503 株、*A. catenella* OF072 株、*A. lusitanicum* AL1V 株、*A. ostenfeldii* 0287 株および *G. catenatum* MZ13 の計 5 種 7 株について N-ST の活性を測定した。その結果、N-ST は全ての株において活性が検出され、N-ST が PSP 原因渦鞭毛藻類に遍在する酵素であることが示唆された。

第5章 *Gymnodinium catenatum* からの 11-hydroxy STX を基質とする硫酸基転移酵素の精製とその性質 ならびに PSP 原因渦鞭毛藻類における O-ST の分布

前章までで明らかにしてきた N-ST は、PSP 毒への 2 つの硫酸基付加部位、すなわち N21 位 と C11 位のうち N21 に特異的に硫酸基を付加する酵素である。これまでに報告されている ST は、硫酸基付加部位はアミノ基と水酸基に限られ、その多くが水酸基への硫酸基転移酵素である(Matsui and Homma 1994)。アミノ基への硫酸基転移酵素は Arylamine-ST(Roy 1960, Ramswamy and Jakoby 1987)と N-heparan sulfate-ST (Hashimoto et al. 1992, Orellana et al. 1994) のみに限られる。ここで、PSP 毒の C11 位の硫酸基について注目すると、この部位の硫酸基はエステル硫酸として付加していることから、第一反応としてまず酸化が起こり、生成した水酸基に硫酸基が付加するのではないかと考えられる(Fig.1-3)。また一般に、硫酸基転移反応は生体内において、第一相反応である酸化反応につづく第二相反応である抱合反応の一つとして知られている(佐藤・大村 1988)。そこで、GTX2+3 を加水分解することによって C11 位が水酸化された 11- α 、 β -hydroxy STX (11-hyd STX)を人工的に調整し、これを基質として *G. catenatum* の粗酵素液中の ST の活性の検索を行った。その結果、11-hyd STX を C1+2 へと変換する活性が見い出された。しかしながら N-ST には 11-hyd STX を GTX2+3 へと変換する活性は認められなかったことから、11-hyd STX を GTX2+3 へと変換する N-ST とは異なる ST が存在すると考えられた。そこで 11-hyd STX を基質とする ST について各種カラムを用いて分離を試みたところ、11-hyd STX の C11 位に硫酸基を転移し GTX2+3 へと変換する O-sulfotransferase (O-ST) 活性を見い出した。そこで本章では *G. catenatum* GC21V 株の藻体を用い、O-ST の精製を試み、諸性質の検討を行った。また、前章で用いた *G. catenatum* MZ13 株と *Alexandrium* 属 4 種 7 株について O-ST の分布を調べた。

5-1 材料及び方法

5-1-1 *G. catenatum* GC21V の培養及び集藻

3-1-1 に従った。

5-1-2 11-hydroxy STX を基質とする硫酸基転移酵素 (O-ST) の精製

5-1-2-1 粗酵素液の調製

5-1-1 で集藻し、 -80°C にて保存しておいた藻体（約 3 g）を湿重量と同量の 200 mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁し、氷冷下で超音波破碎を行った。100,000 g、30 分間の超遠心分離によって得た上清に硫酸アンモニウムを 80 % 飽和になるように加え、氷冷下で攪拌しながら塩析を行った。次に、25,000g、30 分間の超遠心分離によって得た沈澱を緩衝液 A に溶解し、同緩衝液に対して一晚透析した。これを粗酵素液とし、以下順次カラムに供した。

5-1-2-2 DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー

緩衝液 A に懸濁した DEAE-cellulose DE 52 (Whatman 社) を C 10 / 40 カラム (ϕ 10 × 100 mm) (Pharmacia 社) に充填し、緩衝液 A で平衡化したこのカラムに 5-1-2-1 で調製した粗酵素液を流速 1.0 ml / min で添加し、緩衝液 A で洗浄した。その後、0.1、0.3 及び 2.0 M NaCl を含む緩衝液 A のステップワイズにより試料を溶出した。各画分の活性を測定し、活性の認められた画分を緩衝液 B に対して透析し、次のカラムの試料とした。

5-1-2-3 adenosine 3',5'-diphosphate (PAP)-agarose アフィニティークロマトグラフィー

緩衝液 B に懸濁した PAP-agarose (Sigma 社) を XK 16/40 カラム (ϕ 16 × 50 mm) (Pharmacia 社) に充填し、Buffer B により平衡化した。その後、5-1-2-2 で調製した試料を、流速 0.5 ml / min で添加した。緩衝液 B で洗浄した後、1.0、2.0 M KCl を含む緩衝液 B を用いたステップワイズにより溶出した。得られた各画分を緩衝液 D に対して透析した後、活性を測定した。活性の認められた画分を緩衝液 A に対して透析し、次のカラムの試料とした。

5-1-2-4 Mono Q 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

FPLC System (Pharmacia 社) に MonoQ HR 5 / 5 カラムを装着し、緩衝液 A で平衡化した。スーパーループを用いて試料を流速 1.0 ml/min で添加した後、緩衝液 A でカラムを洗浄した。その後、0 - 0.3 M NaCl を含む緩衝液 A の濃度勾配により試料を溶出した。

5-1-3 酵素活性の測定法

酵素反応は、エッペンドルフチューブを用いて、PAPS (5 μ l)、酢酸緩衝液 (pH 6.0) (40 μ l) をそれぞれ終濃度 0.5 mM、160 mM となるように調製し、11-hydroxy STX を 5 μ l 加え、50 μ l とした反応溶液に酵素液を 50 μ l 加え全量を 100 μ l とし、 35°C 、1 時間反応を行った。反応は、100 μ l の 0.5

M 酢酸を添加して停止した。反応後の試料をウルトラフリー C3LGC (Millipore 社) を用いて分子量 10,000 の限外濾過を行い、濾液を HPLC 蛍光分析に供し、反応産物を定量した。なお、11-hydroxy STX は、鹿児島大学水産学部の荒川修博士が GTX2+3 を加水分解することにより調製されたものを分譲していただいたもので、その濃度は、標準試料が存在しないため不明であるが、HPLC 蛍光分析に供したところ、クロマトグラム上での検出には、十分量であることを確認している。

5-1-4 O-ST の諸性質の検討

3-1-3 に従って調べた。

5-1-5 PSP 原因渦鞭毛藻類における O-ST の分布

4-1-11-1 に従って調製した粗酵素液について、5-1-3 に記した反応条件下で反応を行い、O-ST の活性を測定した。

5-2 結果

5-2-1 *G. catenatum* GC 21 V 株からの O-ST の精製

藻体を破碎後、硫酸分画、透析を行ったが、藻体由来の PSP 毒を完全に取

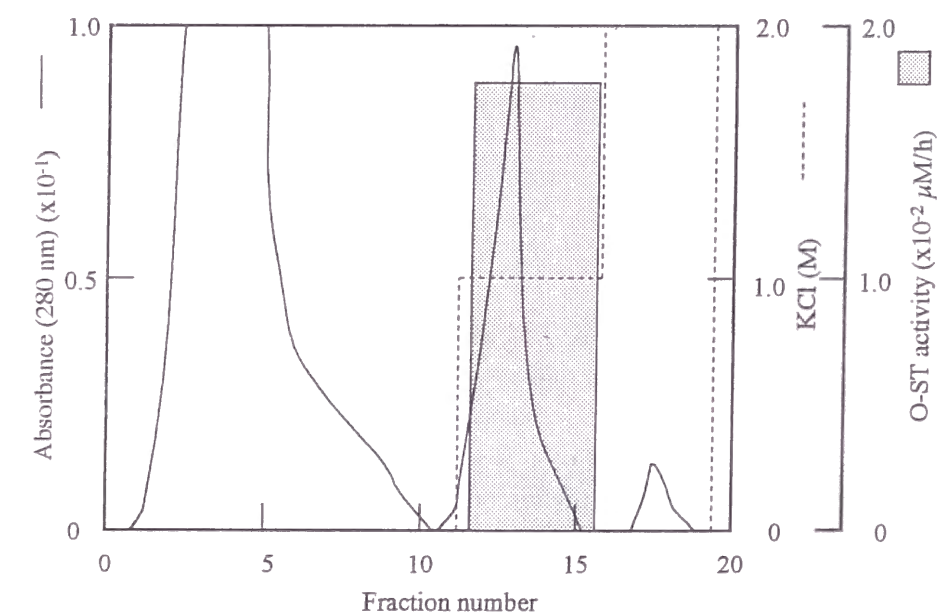
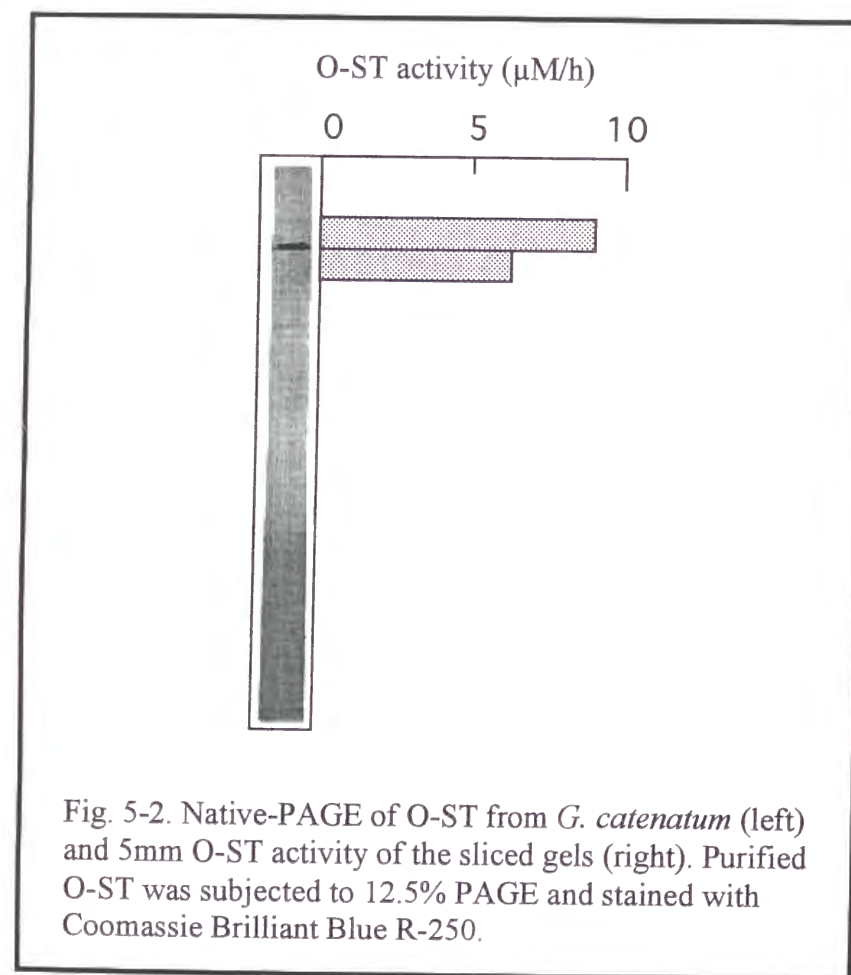


Fig. 5-1. PAP-agarose chromatography of O-ST from *G. catenatum* GC21V. O-ST active fraction on DEAE-cellulose column was applied to a PAP-agarose column equilibrated with buffer B. Protein was eluted by stepwise of buffer B containing 0M, 1.0 M and 2.0 M KCl.

Table 5-1. Summary of purification of O-ST from *G. catenatum* GC 21 V

	Total Protein (mg)	Total Activity ($\mu\text{M GTX2+3 / h}$)	Yield (%)	Specific Activity ($\mu\text{M GTX2+3 / h}\cdot\text{mg}$)	Purification Factor (fold)
Crude extract	23.7	—	—	—	—
80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	21.3	—	—	—	—
DEAE-cellulose	11.1	660	100	59.5	1
PAP-agarose	1.03	183	28	177	3
Mono Q	0.056	27.8	4.2	501	8

— : not analyzed



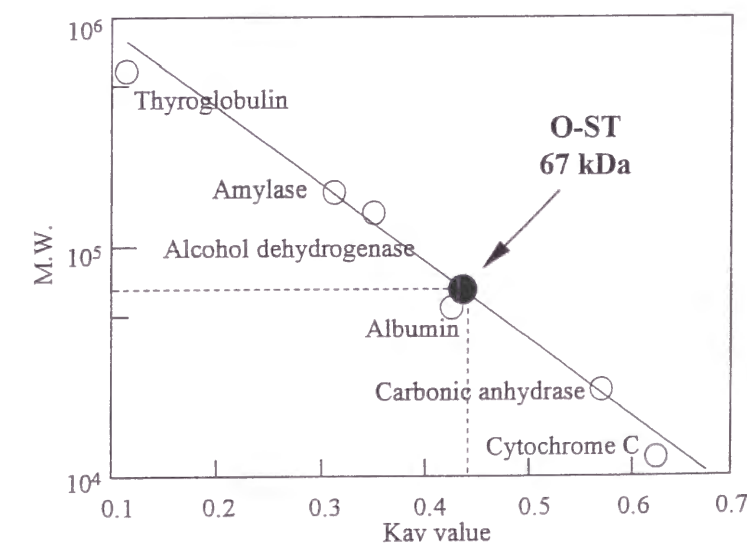
り除くことができなかったため、O-ST 活性を測定することはできなかった。DEAE-cellulose に供した結果、O-ST は 0.1 M NaCl を含む Buffer A により

溶出される画分に溶出された。その際、活性画分には PSP 毒の混入は認められなかった。次に活性画分を PAP-agarose に供した。その結果 O-ST は 1.0 M KCl を含む Buffer B により溶出される画分に溶出した (Fig. 5-1)。その後、本活性画分を Mono Q に供した。その結果、O-ST は 1.5 - 1.7 M NaCl を含む Buffer A により溶出される画分に溶出された。本酵素の精製のまとめを Table 5-1 に示す。最終的に O-ST は約 8 倍にまで精製された。また、Mono Q カラム後の活性画分を Native-PAGE に供したところ、単一のバンドを示した (Fig. 5-2)。さらに、Native-PAGE からゲルスライスにより回収された O-ST 活性は、上記の単一バンドの Rf 値と同一の Rf 値で最大であったことから、このバンドが O-ST を示していることが証明された (Fig. 5-2)。これらの結果より、O-ST の精製は完了したと考えた。

5-2-2 *G. catenatum* GC 21 V 株からの O-ST の諸性質

精製された O-ST を用いて性質を検討した。ゲル濾過による分子量は約 67 kDa であった (Fig. 5-3)。また、精製した本酵素を SDS-PAGE に供したところ分子量約 65 kDa の位置に一本のバンドが得られたことから、O-ST は分子量約 65 kDa のモノマーであることが示された (Fig. 5-4, 5-5)。

O-ST の基質の特異性について調べた。これまでに哺乳類や植物の ST において硫酸基受容体として報告されている物質や、dcSTX、neoSTX は O-ST 活性には影響をほとんど与えなかったが、STX を加えた場合活性が約 42 % にまで

Fig. 5-3. Molecular weight determination of O-ST from *G. catenatum* GC21V by Superdex 200 HR.

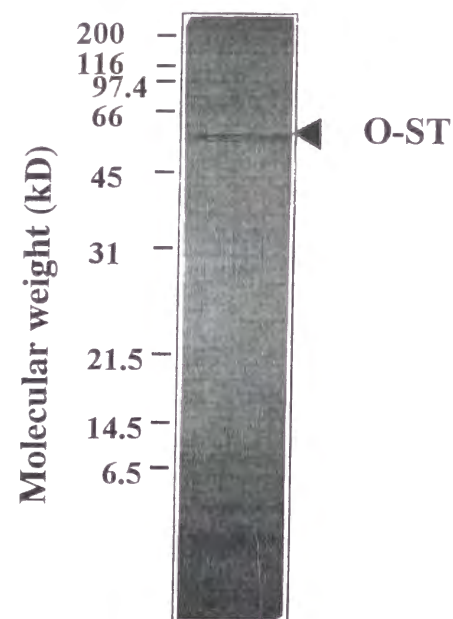


Fig. 5-4. SDS-PAGE of purified O-ST. N-ST active fraction from MonoQ chromatography was subjected to 12.5 % SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

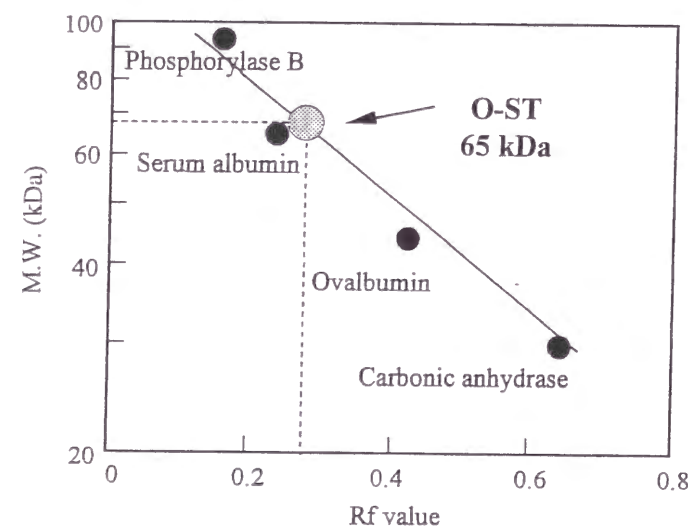


Fig. 5-5. Molecular weight determination of *G. catenatum* O-ST by SDS-PAGE.

低下したがそれ以外の物質では顕著な阻害効果は認められなかった (Table 5-2)。

硫酸基供与体として PAPS の代わりに 4MUS または PNS を加えた場合、さらに APS を加えた場合についても N-ST の活性を測定し、本酵素の硫酸基供与体の特異性について調べた (Table 5-3)。しかしいずれの場合も活性は検出されず、本酵素は硫酸基供与体として PAPS に特異性があることが明らかになった。

Table 5-2. Effects of PSP toxins and various compounds on O-ST activity from *G. catenatum* GC21V

Compounds ^a	Relative activity(%)
None	100
STX	42
neoSTX	74
dcSTX	74
p-Nitrophenol	90
Naphtylamine	81
L-Tyrosine	149
L-Tyrosine methyl ester	101
L-Tyramine	81
Dopamine	128
Epinephrine	72
Estron	79

^a These compounds were added to standard reaction mixture to a final concentration of 200 μ M.

た。O-ST 活性に与える pH の影響を調べたところ、HPES 緩衝液を用いた pH 7 で最も高い活性が得られた。しかし、PIPES 緩衝液では pH 7.0 より pH 6.0 の場合の方が活性が高く、O-ST の至適反応 pH は 6.0–7.0 であることが示唆された (Fig. 5-6 A)。温度が O-ST 活性に与える影響を調べた結果、至適反応温度は 35 $^{\circ}$ C であった (Fig. 5-6 B)。

O-ST が反応に際して金属イオンを要求するかを調べた結果、加えた 4 種の金属イオンにおいて O-ST 活性の促進は見られず、亜鉛イオン、コバルトイオンにより活性は阻害された。また金属のキレーターである EDTA を

Table5-3. Sulfate donor specificity of the O-ST from *G. catenatum* GC21V.

Sulfate donor	Activity
PAPS (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate)	+
APS (adenosine 3'-phosphate 5'- sulfate)	—
PNS (p-nitrophenyl sulfate)	—
Mg ₂ SO ₄	—

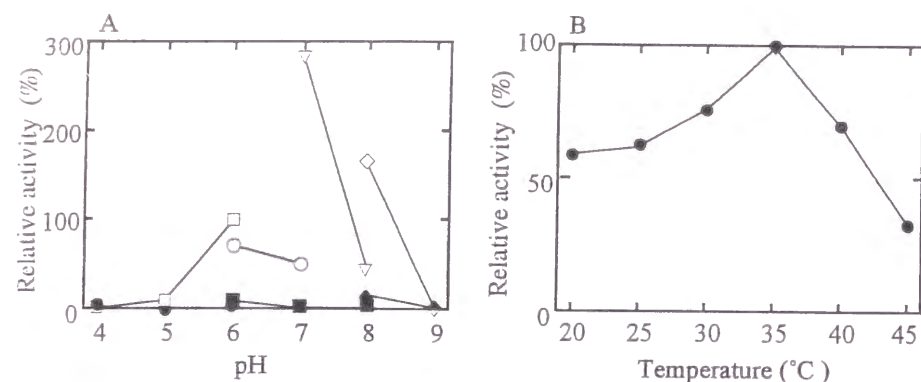


Fig. 5-6. Effects of pH (A) and temperature (B) on *G. catenatum* O-ST activity. Enzyme assay conditions are described in detail in MATERIALS AND METHODS. The activity was measured with partial purified O-ST. A, O-ST activity was assayed using the following buffers: acetate buffer (□) and citrate buffer (●) were used in the range pH 4-6, phosphate buffer in the range pH 6-8 (■), PIPES buffer in the range pH 6-7(○), HEPES buffer in the range pH 7-8 (▽), Tris buffer in the range pH 8-9 (▲) and glycylglycine buffer in the range pH 8-9(◇). B, O-ST activity was assayed at the indicated temperature under standard assay conditions.

Table 5-4. Effect of divalent cations on the O-ST activity.

Cation ^a	Relative activity(%) ^b
None	100
Mg ²⁺	96
Co ²⁺	36
Ca ²⁺	94
Zn ²⁺	17
25 mM EDTA	100

^a Divalent cations (4mM, final concentration) were added as chloride salts.

^b The enzyme activity was measured with partial purified N-ST from *G. catenatum* GC21V.

するとともに O-ST 活性の低下が見られ、1.0 M で共に約 30 % まで活性が低下した。しかしながら、2.0 M といった高塩濃度においても、O-ST 活性が完全に阻害されることはなかった。

5-2-3 PSP 原因渦鞭毛藻類における O-ST の分布

G. catenatum GC21V 株を除く *G. catenatum*、*A. tamarense*、*A. catenella*、*A. lusitanicum* および *A. ostenfeldii* の 5 種 8 株について O-ST の分布を

加えた場合にも O-ST 活性に変化が見られなかったことから、O-ST は金属イオンを要求しないことが示された (Table 5-4)。O-ST の反応産物の一つである PAP が O-ST 活性に与える影響を調べた (Fig.5-7)。その結果、PAP 濃度の増加に伴い O-ST 活性の低下が見られ、5mM の PAP 濃度において完全に阻害された。KCl 及び NaCl が O-ST 活性に与える影響を調べた (Fig. 5-8)。その結果、KCl、NaCl 濃度が増加

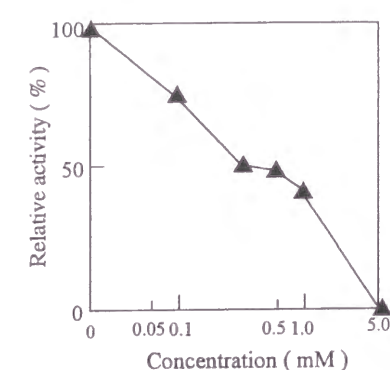


Fig. 5-7. Effect of PAP on O-ST activity. The activity was measured with partial purified O-ST.

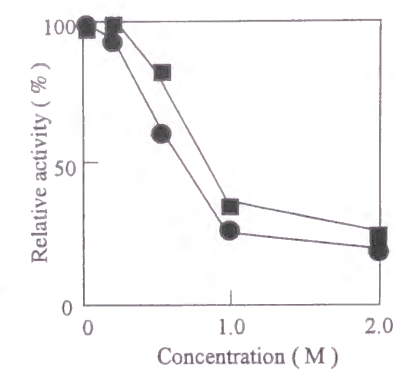


Fig. 5-8. Effect of NaCl(■) and KCl(●) on O-ST activity. The activity was measured with partial purified O-ST.

Table 5-5. Distribution of O-ST among toxic dinoflagellates.

Strains	O-ST activity
<i>G. catenatum</i> GC21V	+
MZ13	+
<i>A. tamarense</i> HI38	+
At503A	+
At304A	+
<i>A. catenella</i> Acko5	-
OF072	-
<i>A. lusitanicum</i> AL1V	+
<i>A. ostenfeldii</i> 0287	+

調べた結果を Table 5-5 に示した。O-ST は *A. catenella* を除き全ての種、株においてその活性が認められた。しかし、N-ST と同様に *G. catenatum* MZ13 株以外の株では、その比活性は低かった。

5-3 考察

G. catenatum からの O-ST は、PAPS のアナログである PAP をリガンドとして結合したアフィニティークロマトグラフィーである PAP-agarose に吸着したため、N-ST にくらべ非常に少ないカラム操作で精製を行うことが可能であった。

本カラムは、ST の精製の際に汎用され、非常に効果的な操作であることが報告されている (Hondoh et al 1993, Falany et al. 1989)。

G. catenatum からの O-ST と N-ST の性質のまとめを Table 5-6 に示す。O-ST は、65 kDa のモノマーであり、*G. catenatum* および *A. catenella* から精製した N-ST とほぼ同一の分子量を示した。これまでに報告されている ST は分子量約 30-35 kDa のサブユニットから成るオリゴマーであり (Matsui and Homma 1994)、N-ST と O-ST とも似約 60 kDa のモノマーとして活性を示すことは、これらの PSP 毒に対する ST に特徴的な側面であるといえるかもしれな

Table 5-6. Comparison of O - ST and N - ST from *G. catenatum* GC 21 V

	O - ST	N - ST
Substrate(s)	11- α,β -hydroxy STX	STX GTX 2+3
Product(s)	GTX 2+3	STX \rightarrow GTX 5 GTX 2+3 \rightarrow C1+C2
Sulfate Donor	PAPS	PAPS
Optimum pH	7.0	6.0
Optimum temperature	35 °C	25 °C
Cation Requirement	none	Mg ²⁺ , Co ²⁺
Molecular Weight	65 kDa (Monomer)	59 kDa (Monomer)

い。

本酵素の基質特異性を検討したところ、11-hyd STX を含む反応液に STX を加えた場合のみ活性が約 40 % にまで低下したが (Table 5-2)、STX を基質として添加しても他の PSP 毒成分の生成が見られなかったことから、O-ST は、11-hyd STX を特異的に硫酸基受容体として利用することが示唆された。また、STX を加えた場合に O-ST 活性が低下し、dcSTX および neoSTX を加えた場合には O-ST 活性に顕著な変化が見られなかったことから、O-ST の基質の認識にはカルバモイル基や N 1 位の OH 基の有無が重要であることが示唆された (Fig.1-1)。今後は、11-hyd neoSTX を調製し、O-ST の硫酸基転移活性の有無を検討する必要があると考えられる。また、本実験では 11-hyd STX の標準試料が得られず、O-ST の基質に対する親和性を検討することができなかった。

O-ST 活性に与える反応温度の影響を調べた結果、至適反応温度は 35 °C であり、同じ株から精製された N-ST より 10 °C 高かった。*G. catenatum* GC21V 株においては培養温度を変化させても毒組成は変化しないことが確認されている。これらの二種類の ST の発現量が調節されることにより毒組成比が一定に保たれている可能性があり、今後、温度変化に伴う 2 つの ST の発現量の変化を調

べる必要がある。pH が O-ST 活性に与える影響を調べた結果、O-ST の至適反応 pH は HEPES 緩衝液を用いた場合 7.0 であることが示されたが、同一の pH においても緩衝液の種類により活性に大きな差が出ることが明らかとなった。たとえば至適反応 pH である 6.0-7.0 においては、リン酸緩衝液を用いた場合には活性が認められなかった。このことは、*Flavelia chloraefolia* から精製された flavonol 4'-ST が、リン酸緩衝液を用いた場合に全く活性を示さないという報告とよく似ており (Varin and Ibrahim 1992)、今後は広域緩衝液等を用いて、同一緩衝液における至適反応 pH を調べる必要があるだろう。

また、O-ST は金属イオンを要求しないことが示された。*G. catenatum* GC21 V 株の N-ST は Co²⁺ と Mg²⁺ によって活性が促進されることから、O-ST は、金属要求性において異なることが確認された。

また、代表的な PSP 原因渦鞭毛藻類について O-ST の分布を調べたところ、*A. catenella* 2 株を除く 4 種 6 株においては O-ST の活性を確認できた。*A. catenella* 2 株より O-ST 検出されなかったことについては、至適反応条件が既に精製されている O-ST と異なるためであると考えられる。第 4 章で明らかになったように、AcN-ST の至適反応条件は、PAPS に対する親和性や反応の至適 pH あるいは金属要求性などの点において GcN-ST のものとはかなり異なっている。そのため、今後は反応条件のさらなる検討を行う必要があり、またこれにより *A. catenella* 2 株においても O-ST の活性も見いだせることができるかもしれない。このように検討の余地は残されているが、O-ST も広く PSP 原因渦鞭毛藻類分布していることが示唆された。

以上をまとめると、PSP 毒の N-21 位と C-11 位への硫酸化はそれぞれ異なる 2 つの酵素によって行われることが明らかとなった。いずれの ST も非常に基質特異性が高く、これらの酵素について遺伝子レベルでの研究を進めることによって、PSP 毒の生合成経路の解明だけではなく、PSP 毒の生理学的意義にも迫ることが可能となるかもしれない。

5-4 摘要

PSP 毒の C11 位の硫酸基はエステルとして付加されていることから、硫酸基転移反応に先立ちまず C11 位が OH 化されることが必要であると考えた。そこで、GTX 2+3 を加水分解して、C11 位が OH 化された 11- α,β -hydroxy STX を基質として酵素活性を検索したところ、*G. catenatum* GC21V の粗酵素液中に GTX2+3 へと変換する活性 (O-ST)を見いだした。そこで、*G. catenatum* GC21V 株より DEAE-cellulose、PAP-agarose、Mono Q の各カラムを用いて O-ST の精

製を試み、電気泳動的に単一にまで精製を行った。精製した本酵素は、65kDa のモノマーで、11- α , β -hydroxy STX にのみ活性を有し、硫酸基供与体として PAPS に特異性を示した。また、反応の至適温度が 35°C、至適 pH は 7.0 で、反応に金属イオンを要求しなかった。以上から、PSP 毒の N-21 位と C11 位への硫酸化はそれぞれ異なる酵素によって行われることが明らかとなった。

また、*A. tamarense* HI28 株、At304 株、At503 株、*A. catenella* Acko5 株、OF072 株、*A. lusitanicum* AL1V 株、*A. ostenfeldii* 0287 株および *G. catenatum* MZ13 の計 5 種 8 株について O-ST の活性を測定した。その結果、O-ST は *A. catenella* の 2 株を除く 7 株において活性が確認され、O-ST は PSP 原因藻類に広く存在する酵素であると考えられた。

PSP 毒には N21 位と C11 位の 2 カ所に硫酸基付加部位が有り、それぞれに対して特異的な N-ST および O-ST を *G. catenatum* より見出し、精製した。これらの ST は、いずれも基質特異性が高く PSP 毒成分に対してのみ活性を有した。特に、N-ST については *G. catenatum* とは属レベルで異なる *A. catenella* からも見出されたことにより、これらの ST が、PSP 毒原因微細藻類に広く存在する可能性がある。そこで、代表的な PSP 毒原因渦鞭毛藻類、*G. catenatum*、*A. tamarense*、*A. catenella*、*A. lusitanicum* および *A. ostenfeldii* の 5 種 9 株について N-ST と O-ST の分布を調べたところ、N-ST は全ての株において、また、O-ST は *A. catenella* の 2 株を除く 7 株において活性が確認された。

このように、これらの ST が、PSP 毒原因藻類に広く存在する可能性が示されたことから、N-ST と O-ST を海域における PSP 毒原因微細藻類を検出し、動態を追跡するためのマーカーとして用いることが期待される。しかし一方で、PSP 毒を生産しない *G. catenatum* において N-ST 活性が検出されたことから、N-ST は、PSP 毒の生合成にはリンクしていない酵素であるとの報告(大島 1997)もあり、PSP 毒の生合成とこれらの ST の関係を明らかにする必要がある。

最近になり、Taronchen-Oldenbulg ら(1997)は同調化された *A. fundyense* を用いて、各細胞周期の PSP 毒量を測定した。その結果、1 細胞当たりの毒量は G1 期にのみ増加することが明らかとなり、PSP 毒生合成と細胞周期の関連を主張している。そこで本章では、*G. catenatum* を用いて、同調化を試みた上で日周期での ST の比活性と藻体内の PSP 毒量の変化を調べることにより、ST が、PSP 毒の生合成に直接関与した酵素であるのかについて検討を行った。なお本実験では、日周期の各時間ごとに採取できる藻体量が微量で、O-ST の活性の検出は困難であったため、比活性が低い場合でも測定が可能な N-ST のみの活性を測定した。

6-1 材料及び方法

6-1-1 *G. catenatum* GC21V 株の同調化の試み

培養株の同調化は Taronchen-Oldenbulg ら(1997)の方法に従った。14L:10D の明暗周期下で培養していた *G. catenatum* GC21V 株の培養藻体を 82 時間の暗条件下に置くことにより細胞を G1 期にそろえた後、再び 14L:10D の明暗周期を与えて細胞の同調化を試みた。また、暗条件を 58 時間と 38 時間与える処理

についても検討した。

6-1-2 *G. catenatum* GC21V 株の各日周期のサンプルの採取

対数増殖期の細胞を 500 cells/ml になるように 2L の駒形フラスコ 8 本に接種し、7 本を N-ST 活性測定用、1 本を毒量測定用および細胞周期解析用とした。接種後 5 日目の 9 時から翌日 9 時まで 2 時間毎に 2L ずつの集藻を計 7 回行った。同時に毒量測定用の 1 本から毒量測定用および細胞周期解析用サンプルとして 30 ml ずつ培養液を採取した。

6-1-3 毒量・毒組成の測定

毒量測定用サンプルを氷冷下で計 3 分間の超音波破碎を行い、ウルトラフリー C3LGC (Millipore 社) を用いて 8,100g×20 の遠心分離 (トミー精工社 MRX-150) による分子量 10,000 での限外濾過を行った。得られた濾液を HPLC 蛍光分析に供し、2-1-4 に従って毒量・毒組成を測定した。

6-1-4 粗酵素液の調製

藻体湿重量の 2 倍量の 50 mM Tris-HCl buffer (pH8.0) に懸濁し、氷冷下で計 5 分間の超音波破碎を行った。40,000g×30min の超遠心分離 (Kontron 社 Centrikon T-2080) によって得た上清に硫酸アンモニウムを 80 % 飽和になるように加え、攪拌しながら 5℃ で塩析を行った。次に 25,000g×30min の遠心分離によって得た沈澱を 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し、同緩衝液に対して一晩透析を行ったものを粗酵素液とした。得られた粗酵素液を用いて、3-1-2 に従い N-ST の活性を測定した。また同時に、3-1-7 に従いタンパク質の定量を行った。

6-1-5 細胞周期の解析

6-1-5-1 細胞周期解析用サンプルの調製

6-1-2 の細胞周期解析用の藻体を 1,200g×5min の遠心分離により集めた後、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した。懸濁した細胞に 4 ml の 99.5% エタノールを加え、-20℃ 下で最低 24 時間放置し、固定および自家蛍光色素の脱色を行った。色素を完全に脱色した後、このサンプルを 2,700g×5min の遠心分離を行い、上清を除去し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した。次にこのサンプルに RNase を 1mg/ml になるように添加し、37℃ で 1 時間反応させた。その後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄し、Propidium Iodide (PI) を 10 g/ml になるように加え、氷冷下で核染色を 30 分間行った後、0.1 M

リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した。なお核染色は、PI が退色しないようにフローサイトメーターによる分析の直前に行った。

6-1-5-2 フローサイトメーターによる解析

フローサイトメーターには EPICS Elite Flow Cytometer (Coulter 社) を使用した。サンプルの励起レーザーとして、波長が PI の励起波長域にある 488nm のアルゴンレーザーを用いた。PI の蛍光波長を 610~620nm (PMT4) とし、これに加えて前方散乱光 (Forward Scatter : FS) と側方散乱光 (Side Scatter : SS (PMT1)) を検出パラメータとした。なお前方散乱光と側方散乱光はそれぞれ細胞の大きさと細胞表面の複雑さに相関のあるパラメーターである。

6-1-5-1 のサンプルを 80μm のナイロンフィルターで濾過し、フローサイトメーターに供した。まず、前方散乱光と側方散乱光の 2 つのパラメーターより、本藻と考えられる細胞集団をゲーティングし、ゲート内の細胞について PI 赤色蛍光量を測定した。

6-2 結果

6-2-1 *G. catenatum* GC21V 株の同調化の試み

Taronchen-Oldenbulg ら (1997) の方法に従い、*G. catenatum* GC21V 株の同調化を試みた。しかし、82 時間の暗期条件下に細胞を置くことにより、ほぼ全細胞が死滅した。そこで、暗期に置く時間を 58 時間と 38 時間と短くした条件についても検討を行った。しかし、58 時間でもほぼ全細胞が死滅した。また、38 時間でも生細胞はいるものの、通常の明暗周期を与えても増殖は認められなかった。また、38 時間暗条件下に置いた細胞についてフローサイトメーターによって 24 時間細胞周期を解析したところ、約 9 割の細胞は G1 期にとどまったままで、Taronchen-Oldenbulg らの方法をそのまま本藻へ適用することは不可能であった。

6-2-1 *G. catenatum* GC21V 培養株の日周期における N-ST 活性 と PSP 毒量の変動

本藻の同調化をあきらめ、対数増殖期の 1 回の明暗サイクルを通じて二時間おきに藻体を集め、毒量の変化および N-ST 活性の変化について調べた。また同時に細胞周期についてもフローサイトメーターにより検討した。その結果を Fig. 6-1 に示す。

まず毒量は、明期には タンパク質 1mg 当たり 0.3-0.5 pmole で推移し、暗

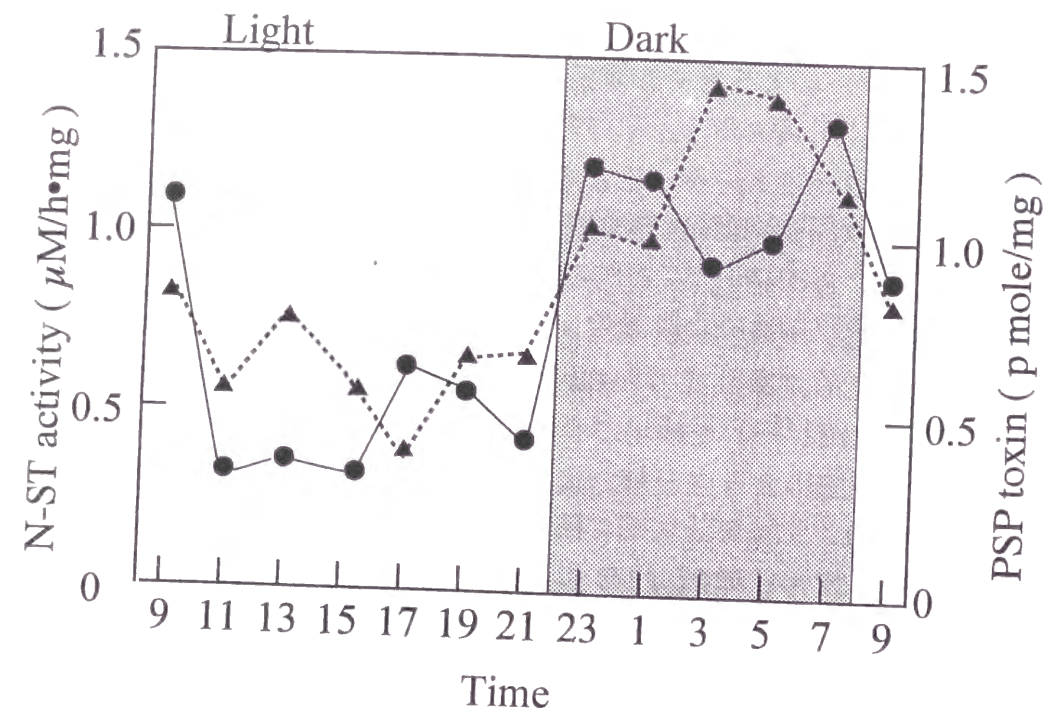


Fig. 6-1. Changes in the PSP toxin content and N-ST activity as a function of a light-dark cycle in batch culture of *G. catenatum* GC21V. Cells in early exponential phase were used and monitored at 2h intervals for 24 h. (▲), PSP toxin content per mg protein; (●), N-ST activity to GTX 2+3 measured using dialysed (NH₄)₂SO₄ precipitate.

期にはいと毒量が急激に増大して、暗期中期にはピークとなり約 1.4 pmole 達し、その後再び減少した。タンパク質当たりの毒量は、明期から暗期にかけて最大で 5 倍に増えた。細胞周期を解析したところ、日周期を通じ 80-85% の細胞が G1 期であり、細胞の分裂はわずかししか認められなかった。しかし、細胞分裂期を示す G2+M 期の細胞は暗期の後期にわずかながら(約 5%)増加した。一方、N-ST 活性は、明期には低く 0.3-0.5 μM/h·mg であったのが、暗期にはいと最大で 1.3 μM/h·mg にまで上昇し、毒量の変動と非常に一致した挙動を示した。

6-3 考察

これまでの報告で *G. catenatum* (吉田 1995)、*A. catenella* (Boyer et al. 1987)、*A. tamarense* (Kim et al. 1993 a)、*A. excavatum* (Oshima et al. 1978)、*A. fundyense* (Anderson et al. 1990b)、*Pyrodinium bahamense* (Usup et al. 1994) などの有毒渦鞭毛藻において、増殖段階によって 1 細胞あたりの毒量

に大きな変化が見られることはよく知られている。増殖時に劇的に毒量が増加するという現象は、細胞分裂による娘細胞への毒の分配 (division loss)、異化作用や培養液中への漏出 (true loss) といった損失の総量と PSP 毒生合成量との差を反映しており、対数増殖期には後者の量が前者を上回るためであると Anderson らは指摘している (Anderson et al. 1990b)。さらに定常期の毒量の低下は CO₂ と NO₃⁻ の欠乏が PSP 毒生合成に何らかの影響を与えているとも述べている。また毒組成については、ほぼ一定に保たれることが知られている。最近、Taronchen-Oldenbulg ら (1997) は、同調化した *A. fundyense* を用いて、G1 期にのみ PSP 毒が生合成され、G2、MS 期には PSP 毒が生合成されないことを示し、PSP 毒生合成と細胞周期の関連を主張している。そこで本研究でも、Taronchen-Oldenbulg らの方法に従って同調化を試みた。しかし *G. catenatum* においては長期の暗期によるストレスから細胞の死滅や G1 期の長期化が著しく、本藻への適用は困難を極め、残念ながら同調化した細胞は得られなかった。以前に金ら (1993 a) が *A. tamarense* において暗期後半に細胞分裂が行われており、同時期に毒量が増加することを報告している。そこで本研究では毒量と N-ST 活性の日周変動について検討することとした。また、毒量を 1 細胞当たりで表わした場合、分裂前の細胞サイズの増大に伴って毒量が増加する可能性があるため、タンパク質 1 mg 当たりでの毒量を求め、その変動を調べた。これにより、N-ST の活性をタンパク質 1 mg 当たりの比活性で表わしているため、毒量と比活性の変動を同じ次元で比較することが可能であると思われる。

まず、細胞周期の解析を行ったところ、*G. catenatum* は明確な細胞周期を示さないものの、毒量に変動が認められた。海洋の独立栄養の渦鞭毛藻は、概日時計 (Circadian rhythm) によって制御された細胞周期 (Diurnal Cell Cycle) を持つと考えられている (Dolah et al. 1995)。Taronchen-Oldenbulg らの実験でも 14h Light : 10h Dark の明暗周期を用いており、これによって細胞に概日リズムを与えられているものと思われる。従って、PSP 毒生合成がいわゆる DNA 合成などの細胞周期と関連するのか、光合成などの他の日周性の代謝系 (Prezelin et al. 1977) と関連するのか判別できない。しかし、N-ST の活性の変動は毒量の変化と非常によく相関したことから、N-ST は、PSP 毒合成と直接関連した酵素であることが示唆された。

今回、0-ST については、日周期の各時間で採取できる藻体が微量であることと、活性の検出感度が低いことから検討できなかった。これについては、モノクローナル抗体を作製する必要があると思われる。また、抗体を用いることによって、比活性ではなく発現量の変化を追跡することができ、PSP 毒生合成と

これらの酵素の関係がより明確になるものと思われる。このように、N-ST と O-ST は PSP 毒原因生物を検出し、動態を追跡するためのマーカーとしてだけでなく、PSP 毒生合成機構を解明するための一助として大いに期待される。

6-4 摘要

PSP 毒の生合成についての知見はほぼ皆無に等しいのが現状であるが、つい最近になり高度に同調化した *A. fundyense* を用い、PSP 毒の生合成が細胞周期の G1 期に行われることが報告された。そこでまず、*G. catenatum* について同調化を試みたが、高度に同調化した細胞を得ることはできなかった。次に、1 回の明暗サイクルを通じて二時間おきに藻体を集め、毒量の変化、細胞周期および N-ST 活性の変化について調べた。その結果、毒量は、暗期にはいと増大し、明期に比べ約 5 倍に上昇した。さらに、N-ST 活性は毒量の変動と非常に一致した挙動を示したことから、N-ST 毒の合成系とリンクした酵素であることが強く示唆された。細胞周期について調べたところ、日周期を通じ 80-85% の細胞が G1 期であり、G2+M 期の細胞は暗期の後期にわずかながら増加した。これは、一般的に渦鞭毛藻類が明け方に細胞分裂を行うことに一致した。しかし、高度に同調化した細胞が得られなかったため、PSP 毒の生合成が細胞周期と関連したものなのか、あるいは、サーカディアンリズムのような他の要因によるのかは明確な結論を見出すまでにはいたらなかった。以上の結果を踏まえ、この二つの ST が PSP 原因生物の現場海域における動態をモニタリングする上で重要なマーカーとして利用でき、さらに、PSP 毒の生合成機構を解明するための一助となることが期待される。

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish poisoning : PSP) は、有毒渦鞭毛藻をプランクトンフィーダーである二枚貝が摂食し毒化する現象で、毒化した貝を人が食するとふぐ中毒に似た高死亡率の食中毒を引き起こすことから、食品衛生上問題となっている。PSP の原因藻として知られる渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属の種と *Gymnodinium catenatum* は、世界各地の沿岸域で毎年のように繰り返し発生し、水産業に大きな被害をもたらしている。さらに、大型船のバラスト水中に混入する PSP 原因渦鞭毛藻のシスト（休眠接合子）によって、PSP 原因種が世界中に伝播しているのではとの指摘もなされ、PSP 分布域の拡大化の解明は急務となっている。

PSP の原因毒は、すべて三環性の基本構造を持ち、側鎖構造の違いによりサキトキシン (saxitoxin : STX) やゴニオトキシン (gonyautoxin : GTX) など約 20 成分から成る。これまでに藻体が生産する多様な PSP 毒成分について、1 細胞当たりの総毒量は培養周期や培養条件によって大きく変動するものの、各毒成分の組成比は一定であることが明らかとなっている。さらに、異なる毒組成比を有する親株間での交配によって得られた F1 株の毒組成比は、親株のいずれかの組成比を示し、毒組成比が両親性 (biparental) の遺伝様式に従う遺伝形質であることが明らかとなっている。PSP 毒の組成比は、PSP 毒の基本骨格形成後の修飾・変換に関与する種々の酵素反応の結果を反映していると考えられるが、これらの酵素についての報告は皆無であった。藻体の有する PSP 毒成分に注目すると、骨格の N21 位あるいは C11 位に硫酸基が付加した成分が多く含まれている。一方、硫酸化反応は、抱合反応の一つとして、ホルモンや薬剤等の生理活性物質の消長に関わる重要な反応であることが、近年明らかにされつつある。そこで本研究では、上記渦鞭毛藻類より PSP 毒に対して特異的な硫酸基転移酵素 (sulfotransferase : ST) を精製して、その性質を明らかにするとともに、毒の生合成との関係についても考察した。また、ST の PSP 原因藻類における分布についても調べた。得られた成果は以下のように総括できる。

1. 各海域から分離した *Alexandrium tamarese* および *A. catenella* の毒成分組成比の地域性

A. tamarese 27 株 (大船渡湾産 7 株、広島湾産 11 株、播磨灘産 7 株、渥美湾産 2 株)、*A. catenella* 25 株 (大船渡湾産 4 株、田辺湾産 7 株、播磨灘産 5 株、浦ノ内湾産 4 株、山川湾産 5 株) の全ての株について毒成分を測定し、両種についてそれぞれ分離地ごとにまとめ、比較を行った。その結果、各地域ご

とに固有の毒組成比が存在することが示された。これらの株について rRNA やモノクローナル抗体を用いた分子分類が行われ、同種であることが認められていることから、藻体の持つ毒組成比を種内解析に用いることが可能であることが示唆され、今後、毒組成比を有毒種の人為的な伝播を追跡するためのマーカーとして利用することが期待される。また、いずれの株においても基本骨格の C11 位や N21 位に硫酸基を有する毒成分を多く含むことから、硫酸基転移反応が PSP 毒の生合成において重要な反応の一つであると考えた。

2. *Gymnodinium catenatum* からの PSP 毒の N21 位に硫酸基を付加する酵素 (N-sulfotransferase : N-ST) の精製とその性質

本研究に用いたスペイン産 *G. catenatum* GC21V 株は、*A. tamarese* および *A. catenella* にくらべ 1 細胞当たりの毒量が高く、主成分として分子内に硫酸基が 2 個付加した C1+2 を多く含むことから硫酸基転移酵素の検索には最適な株であると判断した。検索の結果、3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) を硫酸基の供与体とし、STX と GTX 2+3 の N21 位に硫酸基を付加してそれぞれ GTX 5 と C1+2 へと変換する酵素 (N-ST) を見いだした。そこで、約 200 l の培養から藻体を集め、硫酸分画、DEAE-cellulose、Blue Toyopearl、Mono Q、Superdex 200HR の各種カラム操作を行い、N-ST を電気泳動的に単一にまで精製を行った。精製した本酵素の諸性質を検討したところ、59 kDa のモノマーで、基質特異性は極めて高く STX と GTX 2+3 のみに活性を有した。硫酸基供与体として PAPS に対して特異性を有し、 Mg^{2+} と Co^{2+} によって活性が促進された。また、反応の至適温度は 25°C、至適 pH は 6.0 であり、STX と GTX 2+3 に対する K_m 値は、それぞれ 16.1 μM 、29.8 μM であった。

3. *Alexandrium catenella* からの N-ST の精製とその性質ならびに PSP 原因渦鞭毛藻類における N-ST の分布

日本における主たる PSP 原因藻が *A. catenella* および *A. tamarese* であることに留意して、PSP 毒に対して特異的な ST の検索を行ってきたが、非常に微弱な活性しか検出されず、その精製は困難であった。そこで、前章で精製し明らかとなった N-ST の性質に基づき、大量培養により集めた *Alexandrium* 属 *A. tamarese* および *A. catenella* の種からの N-ST の精製を再検討した。N-ST を検索していく上で、GTX5 あるいは C1+2 の成分組成比が高い株は N-ST の活性が高いことが期待される。高知県浦ノ内湾産 *A. catenella* Acko5 株の毒成分を調べたところ、約 95 % が C1+2 であることから、N-ST の活性が高いものと考え、本株より N-ST を精製を試みた。硫酸分画、DEAE-cellulose、Blue Toyopearl、

High-Trap Chelating、Red Toyopearl、Superdex200HR の各種カラム操作によって精製を行った。精製した N-ST の性質を検討したところ、*A. catenella* Acko5 株の N-ST も基質特異性は極めて高く STX と GTX 2+3 のみに活性を有し、PAPS のみを硫酸基供与体として利用した。反応の至適温度は 25 °C、至適 pH は 5.0 であり、反応に金属イオンは要求しなかった。STX と GTX2+3 に対する K_m 値は、それぞれ 4.0 μM と 2.9 μM であった。*G. catenatum* GC21V 株より精製した N-ST の性質と比較するといくつかの点で差異が認められるものの、ともに PAPS を硫酸基の供与体とし、STX と GTX 2+3 の N21 位のみに硫酸基を付加する酵素であった。また、代表的な PSP 原因渦鞭毛藻 *A. tamarese* HI28 株、At304 株、At503 株、*A. catenella* OF072 株、*A. lusitanicum* AL1V 株、*A. ostenfeldii*0287 株および *G. catenatum* MZ13 の計 5 種 7 株について N-ST の活性を測定した。その結果、N-ST は全ての株において活性が検出され、N-ST が PSP 原因渦鞭毛藻類に遍在する酵素であることが示唆された。

4. *Gymnodinium catenatum* からの C11 位の硫酸基を付加する酵素 (O-sulfotransferase : O-ST) の精製とその性質ならびに PSP 原因渦鞭毛藻類における O-ST の分布

PSP 毒の C11 位の硫酸基はエステルとして付加されていることから、硫酸基転移反応に先立ちまず C11 位が OH 化されることが必要ではないかと考えた。そこで、GTX 2+3 を加水分解して、C11 位が OH 化された 11- α, β -hydroxy STX を基質として 酵素活性を検索したところ、*G. catenatum* GC21V の粗酵素液中に GTX2+3 へと変換する活性 (O-ST) を見いだした。そこで、*G. catenatum* GC21V 株より DEAE-cellulose、PAP-agarose、Mono Q の各カラムを用いて O-ST の精製を試み、電気泳動的に単一にまで精製を行った。精製した本酵素は、65kDa のモノマーで、11- α, β -hydroxy STX にのみ活性を有し、硫酸基供与体として PAPS に特異性を示した。また、反応の至適温度が 35°C、至適 pH は 6.0 で、反応に金属イオンを要求しなかった。以上から、PSP 毒の N-21 位と C11 位への硫酸化はそれぞれ異なる酵素によって行われることが明らかとなった。

また、*A. tamarese* HI28 株、At304 株、At503 株、*A. catenella* Acko5 株、OF072 株、*A. lusitanicum* AL1V 株、*A. ostenfeldii*0287 株および *G. catenatum* MZ13 の計 5 種 8 株について O-ST の活性を測定した結果、O-ST は *A. catenella* の 2 株を除く 7 株において活性が確認され、O-ST が PSP 原因藻類に広く存在する酵素であると考えられた。

5. *Gymnodinium catenatum* GC21V 株の日周期における PSP 毒量と N-ST 比活性

の変動

N-ST が PSP 毒の生合成に直接関与した酵素であるのかについて検討を行うために、対数増殖期の 1 回の明暗サイクルを通じて二時間おきに藻体を集め、毒量の変化、細胞周期および N-ST 活性の変化について調べた。その結果、毒量は、暗期に入ると増大し、明期に比べ約 5 倍に上昇した。細胞周期について調べたところ、日周期を通じ 80-85%の細胞が G1 期であり、G2+M 期の細胞は暗期の後期にわずかながら増加した。これは、一般的に渦鞭毛藻類が明け方に細胞分裂を行うことに一致した。しかし、高度に同調化した細胞が得られなかったため、PSP 毒の生合成が細胞周期と関連したものなのか、あるいは、サーカディアンリズムのような他の要因によるのかは明確な結論を見出すまでにはいたらなかった。一方、N-ST 活性は毒量の変動と非常に一致した挙動を示したことから、N-ST 毒の合成系とリンクした酵素であることが強く示唆された。

以上の結果より、PSP 毒への硫酸基付加反応は極めて基質特異性の高い二つの ST、すなわち N-ST と O-ST によってなされることが明らかとなった。第 1 章で示した通り有毒渦鞭毛藻類の示す PSP 毒成分組成に地域性が認められることから、PSP 毒の成分比を決定する因子の一つである ST の遺伝子の塩基配列を比較することによって、現在問題となっている PSP 原因生物の人為的伝播を追跡できるかもしれない。また、これらの ST が、PSP 毒を生産する渦鞭毛藻類に広く認められたことから、PSP 生産する生物に対するマーカーとして N-ST と O-ST を利用できるのではないだろうか。また、最近になり明らかになったいくつかの ST 遺伝子の塩基配列の比較から、ST が遺伝子ファミリーを形成していると考えられている。今後、N-ST および O-ST の遺伝子の塩基配列が明らかになることで、PSP 毒に特異的な ST が、どのような基質に対する ST から分岐してきたのかが推測できるものと思われ、PSP 毒の生理的な機能を考える上でも非常に興味深い。

謝辞

本論文を書き終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました京都大学大学院農学研究科助教授の左子芳彦先生に心から感謝申し上げます。

また、様々なご指導、助言を頂いた同教授内田有恒先生、同助手吉永郁夫先生そして福山大学工学部教授石田祐三郎先生にも深くお礼申し上げます。

また、酵素反応の基質として用いる PSP 毒成分を精製して頂いた鹿児島大学水産学部の荒川修先生と長崎大学水産学部の野口玉雄先生、HPLC 蛍光分析用 PSP 標準試料を分譲して頂いた東北大学農学部教授大島泰克先生に深く感謝の意を表します。*Gymnodinium catenatum* ならびに *Alexandrium* 属藻類培養株分譲して頂いた香川県赤潮研究所の吉松定昭博士、南西海区水産試験場の山口峰生博士、愛知県水産試験場の石田基雄様およびビゴー海洋研究所の B. Reguera 博士に深く感謝いたします。

最後に、本研究を行うに際しご助力して頂いた納谷憲幸様、角谷友則様、藤井亜湖様をはじめとする研究室の皆様や諸先輩方に深く感謝し、心からお礼申し上げます。

参考文献

- Adachi, M., Sako, Y. & Ishida, Y. 1993 a. Application of monoclonal antibodies to field samples of *Alexandrium* species. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 1171-5.
- Adachi, M., Sako, Y. & Ishida, Y. 1993 b. The identification of conspecific dinoflagellates *Alexandrium tamarense* from Japan and Thailand by monoclonal antibodies field samples of species. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59:327-32.
- Adachi, M., Sako, Y. & Ishida, Y. 1994. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). *J. Phycol.* 30: 857-63.
- Adachi, M., Sako, Y. & Ishida, Y. 1996. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. *J. Phycol.* 32: 424-32.
- Anderson, D. M., Kulis, D. M., Sullivan, J. J. & Hall, S. 1990a. Toxin composition variations in one isolate of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Toxicon* 28: 885-93.
- Anderson, D. M., Kulis, D. M., Sullivan, J. J., Hall, S. & Lee, C. 1990b. Dynamics and physiology of saxitoxin in production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. *Mar. Biol.* 104: 511-24.
- Anderson, D. M., Kulis, D. M., Doucette J. C. & Gallagher, E. B, 1994. Biogeography of toxic dinoflagellates in the genus *Alexandrium* from the northeastern United States and Canada. *Mar. Biology*. 120: 467-78.
- Arakawa, O., Noguchi, T., Shida, Y. & Onoue, Y. 1994. Occurrence of carbamoyl-N-hydroxy derivatives of saxitoxin and neosaxitoxin in a xanthid crab *Zosimus aeneus*. *Toxicon* 32: 175-83.
- Boczar, B. A., Beitler, M. A., Liston, J., Sullivan, J. J. & Cattolico, A. 1988. Paralytic shellfish toxins in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture. *Plant Physiol.* 88: 1285-90.
- Boyer, G. L., Sullivan, J. J., Andersen, R. J., Harrison, P. J. & Cembella, A. D. 1986. Use of high-performance liquid chromatography to investigate the production of paralytic shellfish toxins by *Protogonyaulax* spp. in culture. *Mar. Biol.* 93: 361-9.
- Boyer, G. L., Sullivan, J. J., Andersen, R. J., Harrison, P. J. & Taylor, F. J. R. 1987. Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* 96: 123-8.
- Cembella, A. D., Sullivan, J. J., Boyer, G. L., Taylor, F. J. R. & Andersen, R. J. 1987. Variation in paralytic shellfish toxin composition within the *Protogonyaulax tamarensis/catenella* species complex: red tide dinoflagellates. *Biochem. Syst. Ecol.* 14: 311-21.
- Dolah, F.M., Leighfield, T. A. & Hsu, C. K. 1995. Cell division in the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* is phased to the diurnal cycle and accompanied by activation of the cell cycle regulatory protein, CDC2 kinase. *J. Phycol.* 31: 395-400.
- Falany, C. N., Vazquez, M. E. & Kalb, J. M. 1989. Purification and characterization of human liver dehydroxyepiandrosterone sulfotransferase. *Biochem. J.* 260: 641-6.
- Flynn, K., Jones, K. J. & Flynn, K. J. 1996. Comparisons among species of *Alexandrium* (Dinophyceae) grown in nitrogen- or phosphorus-limiting butch culture. *Mar. Biol.* 126: 9-18.
- Franca, S., Viegas, S., Mascarenhas, V., Pinto, L. & Doucette, G. J. 1995. Prokaryotes in association with a toxic *Alexandrium lusitanicum* in culture. In Lassus, P. et al. [Eds.] *Harmful Marine Algal Blooms*, Laboisier Publ. Inc., Paris, pp. 45-51.
- 藤井 亜湖. 1996. 卒業論文: 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* における麻痺性貝毒硫酸基転移酵素に関する研究.
- Hallegraeff, G. M., Steffensen, D.A. & Wetherbee, R. 1988. Three estuarine Australian dinoflagellates that can produce paralytic shellfish toxins. *J. Plankton Res.* 10: 533-41.
- Hallegraeff, G. M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32:79-99.
- Hallegraeff, G. M. 1995. Harmful Algal Blooms: A global overview. In Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M. & Cembella, A. D. [Eds.] *Manual on Harmful Marine Microalgae*, UNESCO, France, pp 1-18.

- Hashimoto, Y., Noguchi, T., & Adachi, T. 1976. Occurrence of toxic bivalves in association with the bloom of *Gonyaulax* sp. in Owase Bay. *Nippon Suisan Gakkaishi* 42: 671-76.
- Hashimoto, Y., Orellana, A., Gil, G. & Hirschberg, C. B. 1992. Molecular cloning and expression of rat liver N-heparan sulfate sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 267: 744-50.
- Henderson, R., Ritche, J. M. & Strichartz, G. R. 1974. Evidence that tetrodotoxin and saxitoxin act at a metal cation binding site in the sodium channels of nerve membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71: 3936-40.
- Hondoh, T., Suzuki, T., Hirano, K., Saitoh, H., Kadofuku, T., Sato, T. & Yanaihara, T. 1993. Purification and properties of estrogen sulfotransferase of human fetal liver. *Biomed. Res.* 14: 129-36.
- Kim, C-H., Sako, Y. & Ishida, Y. 1993a. Variation of toxin production and composition in axenic cultures of *Alexandrium catenella* and *A. tamarense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 59: 633-39.
- Kim, C-H., Sako, Y. & Ishida, Y. 1993 b. Comparison of toxin composition between populations of *Alexandrium* spp. from geographically distant areas *Nippon Suisan Gakkaishi*. 59: 641-46.
- Kim, D-H., Kim, H-S. & Kobashi, K. 1992. Purification and characterization of novel sulfotransferase obtain from *Klebsiella* K-36, an intestinal bacterium of rat. *J. Biochem.* 112: 456-60.
- Kodama, M. 1990. Possible links between bacteria and toxin production in blooms. In E. Graneli et al. [Eds.] *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier, New York, pp.52-61.
- Kodama, M. & Ogata, T. 1988. New insights into shellfish toxins. *Marine Pollution Bulletin* 19: 559-64.
- Kodama, M., Ogata, T. & Sato, S. 1988. Bacterial production of saxitoxin. *Agric. Biol. Chem.* 52: 1075-7.
- Kodama, M., Ogata, T., Sakamoto, S., Sato, S., Honda, T. & Miwatani, T. 1990. Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium *Molaxella* sp. isolated from *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon* 28: 707-14.
- 小金澤昭光, 小谷祐一, 1985. 貝毒問題に関する研究と対策. 貝毒プランクトン-生物学と生態学. 日本水産学会編. 恒星社厚生閣, 東京, pp.9-18.

- Lacomme, C. & Roby, D. 1996. Molecular cloning of a sulfotransferase in *Arabidopsis thaliana* and regulation during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Plant. Mol. Biol.* 30: 995-1008.
- Lee, N-S. Kim, B-T., Kim, D-H. & Kobashi, K. 1995. Purification and reaction mechanism of arylsulfate sulfotransferase from *Haemophilus* K-12, a mouse intestinal bacterium. *J. Biochem.* 118: 796-801.
- Lo-Guidice, J. M., Perini, J. M., Laffite, J. J., Ducourole, M. P., Roussel, P. & Lamblin, G. 1995. Characterization of a sulfotransferase from human airways responsible for the 3-O-sulfation of terminal galactose in N-acetyllactosamine-containing mucin carbohydrate chains. *J. Biol. Chem.* 270: 27544-50.
- Maranda, L., Anderson, D. M. & Shimizu, Y. 1985. Comparison toxicity between populations of *Gonyaulax tamarensis* of eastern North American waters. *Estuar. Cstl. Shelf. Sci.* 21: 401-10.
- Matsui, M. & Homma, H. 1994. Biochemistry and molecular biology of drug-metabolizing sulfotransferase. *Int. J. Biochem.* 26: 1237-47.
- 野口 玉雄, 1982. 麻痺性貝毒の化学. 有毒プランクトン-発生・作用機構、毒成分. 日本水産学編. 恒星社厚生閣, 東京. *ibid.*, pp.88-101.
- Noguchi, T., Asakawa, O. Fukuyo, S., Nishio, S., Tanno, K. & Hashimoto, K. 1990. First occurrence of *Alexandrium catenella* in Frunka Bay, Hokkaido, along with its unique toxin composition. In Graneli, E., Sundstom, B., Edler, L. & Anderson, D. M. [Eds.] *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier, New York, pp. 493-8.
- Ogata, T., Kodama, M. & Ishimaru, T. 1987. Toxin Production in the Dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon* 25: 923-8.
- 岡市 友利, 1997. 赤潮現象. 赤潮の科学 第二版. 岡市 友利編. 恒星社厚生閣, 東京, pp.5-41.
- Orellana, A., Hirschberg, C. B., Wei, Z., Swiedler, S. J. & Ishida, M. 1994. Molecular cloning and expression of a glycosaminoglycan N-acetylglucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase from a heparin-producing cell line. *J. Biol. Chem.* 269, 2270-6.
- Oshima, Y., & Yasumoto, T. 1978. Analysis of toxins in cultured *Goodyaulax Excavata* cells originating in Ofunato Bay, Japan. In Talor D. L. & Seliger, H. H. [Eds.] *Toxic Dinoflagellate Blooms*, Elsevier, New York, pp.377-80.

- 大島泰克, 1982. 麻痺性貝毒の発生状況. 有毒プランクトン発生・作用機構、毒成分. 日本水産学会編. 恒星社厚生閣, 東京, pp78-87.
- Oshima, Y., Hayakawa, M., Hashimoto, M., Kotani, Y. & Yasumoto, T. 1982. Classification of *Protogonyaulax tamarensis* from northern Japan into three strains by toxin composition. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 48: 851-4.
- Oshima, Y., Machida, M., Sasaki, K., Tamaoki, Y. & Yasumoto, T. 1984. Liquidchromatography-fluorometric analysis of paralytic shellfish toxins. *Agric. Biol. Chem.* 48: 1707-11.
- Oshima, Y., K. Sugino, & Yasumoto, T. 1989. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. In Natori, S., Yasumoto, Y. & Ueno, Y [Eds.] *Mycotoxins and Phycotoxins '88* Elsevier, Amsterdam, pp.319-326.
- Oshima, Y., K. Sugino, H. Itakura, M. Hirota, & Yasumoto, T. 1990. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In Graneli, E., Sundstom, B., Edler, L. & Anderson, D. M. [Eds.] *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier, New York, pp. 391-6.
- 大島泰克, 1992. 日本は赤潮の輸出国か-船舶のバラスト水による伝播. 化学増刊 121 化学で探る海洋生物の謎. 化学同人, pp.23-32.
- Oshima, Y., Blackburn, S. I. & Hallegraeff, G. M. 1993a. Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. *Mar. Biol.* 116: 471-6.
- Oshima, Y., Itakura, H., Lee, K., Yasumoto, T., Blackburn, S. & Hallegraeff, G. 1993b. Toxin production by the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. In Smayda, Y. J. & Shimizu, Y. [Eds.] *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Elsevier, Amsterdam, pp. 907-12.
- 大島泰克, 1997. 平成6年度貝毒安全事業報告書 東北大学
- Prezelin, B. B., Hastings, J. B. & Colepicolo, P. 1977. Characterization of photosynthetic rhythms in marine dinoflagellates. *Plant Physiol.* 107: 225-31.
- Ramsway, S. & Jacoby, W. B. 1987. Amine N-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 262: 10039-43.
- Reguera, B. & Oshima, Y. 1990. Response of *Gymnodinium catenatum* to increasing level of nitrate: growth patterns and toxicity. In Graneli,

- E., Sundstom, B., Edler, L. & Anderson, D. M. [Eds.] *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier, New York, pp. 316-9.
- Rigby, G. R. & Hallegraeff, G. M. 1996. Ballast water controls to minimise the translocation and establishment of toxic marine phytoplankton – what progress have we made and where are we going? In Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. [Eds.] *Harmful and Toxic Algal Blooms*, UNESCO, PP. 201-204.
- Rikke, B. A. & Roy, A. K. 1996. Structural relationships among members of the mammalian sulfotransferase gene family. *Biochim. Biophys. Acta.* 1709: 331-8.
- Roy, A. B. 1960. The enzymic synthesis of aryl sulphamates. *Biochem. J.* 74: 49-56.
- Saidha, T. & Schiff, J. A. 1994. Purification and properties of a phenol sulfotransferase from *Euglena* using L-tyrosine as substrate. *Biochem. J.* 298:45-50.
- 左子芳彦, 1988. 渦鞭毛藻の生活環. 海洋科学 20: 80-4.
- Sako, Y., Kim, C-H. & Ishida, Y. 1992. Mendelian inheritance of paralytic shellfish poisoning toxin in the marine dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 692-4.
- Sako, Y., Adachi, M. & Ishida, Y. 1993. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to *Alexandrium* species. In Smayda, T. J. & Shimizu, Y. [Eds.] *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Elsevier, Amsterdam, pp. 87-93.
- Sako, Y., Naya, N., Yoshida, T., Kim, C-H., Uchida, A. & Ishida, Y. 1995. Studies on stability and heredity of PSP toxin composition in the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. In Lassus, P., Arzul, C., Denn, E. E-L., Gentien, P. & Baut, C. M-L. [Eds.] *Harmful Marine Algal Blooms*, Lavoisier, Paris, PP. 345- 50.
- Sato, S. and Shimizu, Y. 1997. Purification of a fluorescent product of the bacterium, *Moraxella* sp.: A neosaxitoxin imposter in HPLC. In *Abstracts and posters classification of international conference on harmful algae*, P.180.
- 佐藤 了・大村 恒雄, 1988. 薬物代謝の酵素系. 講談社
- Schantz, E. J., Mold, J. D., Stanger, D.W., Shavel, J., Riel, F. J., Bowden, J. P., Lynch, J. R., Wyler, S. M. Riegel, B. & Sommer, H. 1957.

- Paralytic Shellfish Poison VI. A Procedure for the Isolation and Purification of the Poison from Toxic Clum and Mussel Tissues. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 5230-5.
- Schantz, E. Z., Lynch, J. M., Vayvada, G., Matsumoto, K. & Ropoport, H. 1966. The purification and characterization of the poison produced by *Gonyaulax catenella* in axenic culture. *Biochemistry* 5: 1191-5.
- Shimizu, Y. 1993. Microalgal metabolite. *Chem. Rev.* 93: 1685-98.
- Shimizu, Y. 1996. Microalgal metabolites. - A new perspective - *Ann. Rev. Microbiol.* 50: 431-65.
- Shumway, S. E. 1990. A review of effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 65-104.
- Shumway, S. E. & Cembella, A. D. 1993. The impact of toxic algae on scallop culture and fisheries. *Rev. Fish. Sci.* 1:121-50.
- Sommer, H. & Meyer, K. F. 1937. Paralytic shellfish poisoning. *Arch. Pathol.* 24: 560-98.
- Strichiartz, G. 1984. Structural determination of affinity of saxitoxin for neuronal sodium channels. Electrophysiological studies on roger peripheral nerve. *J. Gen. Physiol.* 84: 281-305.
- Strichiartz, G., Rando, T., Hall, S., Gitshcier, J., Hall, L., Magnani, B. & Bay, C. H. 1986. On the mechanism by which saxitoxin binds to sodium channels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 479: 96-112.
- Taronchen-Oldenburg, G., Kulis, D. M. & Anderson, D. M. 1997. Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnol. Oceanogr.* 42: 1178-88.
- Taylor, F. J. R. 1984. Toxic dinoflagellates: Taxonomic and biogeographic aspects with emphasis on *Protogonyaulax*. In Ragelis, E. [Eds.] Seafood Toxins., *PACS symposium series* 262, American Chemical Society, Washington, pp. 77-97.
- Tseng, L., Lee, L-Y. & Mazella, J. 1985. Estrogen sulfotransferase in human placenta. *J. Steroid. Biochem.* 22: 611-5.
- Usup, G., Kulis, D. M. and Anderson, D. M. 1994. Growth and toxin production of the toxin dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compresum* in laboratory cultures. *Natural Toxin* 2: 254-62.

- Varin, L. and Ibrahim, R. K. 1992. Novel flavonol 3-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 267:1858-63.
- Weinshilboum, R. M., Otterness, D. M., Akoy, I. A., Wood, T. C., Her, C. & Raftgianis, R. B. 1997. Sulfotransferase molecular biology: DNAs and genes. *FASEB. J.* 11: 3-14.
- 吉田天士, 1995. 修士論文：渦鞭毛藻からの麻痺性貝毒硫酸基転移酵素の精製とその性質

- Sako, Y., Naya, N., Yoshida, T., Kim, C-H., Uchida, A. & Ishida, Y. 1995. Studies on stability and heredity of PSP toxin composition in the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. In Lassus, P., Arzul, C., Denn, E. E-L., Gentien, P. & Baut, C. M-L. [Eds.] *Harmful Marine Algal Blooms*, Lavoisier, Paris, PP. 345- 50.
- Yoshida, T., Sako, Y., Uchida, A., Ishida, Y., Arakawa, O. & Noguchi, T. 1996. Purification and properties of paralytic shellfish poisoning toxins sulfotransferase from toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. In Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. [Eds.] *Harmful and Toxic Algal Blooms*, UNESCO, PP. 499-502.
- Yoshida, T., Sako, Y., Kakutani, T., Fujii, A., Uchida, A., Ishida, Y., Arakawa, O. & Noguchi, T. 1998. Comparative study of two sulfotransferases for sulfation to N-21 of *Gymnodinium catenatum* and *Alexandrium catenella* toxins. In Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. L. & Wyatt, T. [Eds.] *Harmful Algae*, Grafisant, Santiago de Comppstela, PP. 366-9.